

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

Série État, N° 5 - Pharmacie Paris

1°. — Contribution à l'étude de
L'EXTRACTION ET DU TITRAGE
DES BACTÉRIOPHAGES ACTIFS
SUR LES
MICROBES DU GROUPE COLI

2°. — Proposition donnée par la Faculté.

THÈSE
POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTEUR EN PHARMACIE
(Doctorat d'État)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PAR
Maurice CARRON

JURY { MM. RÉGNIER, *Président*
JANOT, *Professeur*
VALETTE, *Maître de Conférences*

PARIS
IMPRIMERIES VIEILLEMARD
16, RUE DE LA GLACIÈRE, 16

—
1942

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

Série État, N° 5 - Pharmacie Paris

1°. — Contribution à l'étude de
L'EXTRACTION ET DU TITRAGE
DES BACTÉRIOPHAGES ACTIFS
SUR LES
MICROBES DU GROUPE COLI

2°. — Proposition donnée par la Faculté.

THÈSE
POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTEUR EN PHARMACIE
(Doctorat d'État)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PAR
Maurice CARRON

JURY { MM. RÉGNIER, *Président*
JANOT, *Professeur*
VALETTE, *Maitre de Conférences*

PARIS
IMPRIMERIES VIEILLEMARD
16, RUE DE LA GLACIÈRE, 16

1942

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. DAMIENS, *Doyen*, O. *, § I.
H. HERISSEY, *Assesseur*, O. *, § I.
H. J. LIONNET, *Secrétaire*, § I.

PROFESSEURS

MM. DAMIENS, O. *, § I. Chimie Minérale.
HERISSEY, O. *, § I. Chimie Biologique.
SOMMELET, *, § I. Chimie Organique.
FABRE, *, § I. Toxicologie.
LAUNOY, O. *, § I. Zoologie.
DELABY, *, § I. Pharmacie Chimique.
PICON, *, § I. Physique.
MASCRE, *, § I. Histoire naturelle des médicaments simples
d'origine végétale.
BACH, *, § I. Botanique.
FLEURY, § I. Chimie Analytique.
REGNIER, § I. Microbiologie.
JANOT, § A. Pharmacie Galénique.

Doyens honoraires : MM. RADAIS, O. *, § I. — GUERIN, O. *, § I.

Professeurs honoraires :

MM. DELÉPINE, O. *, § I et LEBEAU, O. *, § I, Membres de l'Institut.
PERROT, C. *, § I, COUTIERE, O. *, § I et BOUGAULT, O. *, § I.
LUTZ, *, § I.
GORIS, O. *, § I.

MAITRES DE CONFÉRENCES

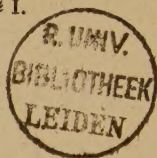
MM. BEDEL, *, § I. Minéralogie. — Législation et déontologie
pharmaceutiques.
CHARONNAT, § I. Hydrologie et Hygiène.
VALETTE, § A. Cryptogamie et technique microbiologique.
Pharmacodynamie.
FONTAINE Histoire naturelle.
GUILLOT Sciences physiques et chimiques.
N. Sciences naturelles.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DOMANGE, § A, trav. pratiques de 1^{re} année. Chimie générale et
pharmaceutique.
GAUTIER, § A, trav. pratiq. de 2^e et 3^e année. Chimie analytique.
PARIS Micrographie.
CORRIEZ, § A. Physique.
DAVID, § I. Microbiologie.
N. Chimie biologique,
Bromatologie et
Pharmacie chimi-
que.

Bibliothécaire en Chef : M. GARNIER, § A.

Bibliothécaire : M^{lle} LAVAUD, § A.



A MES PARENTS

A MA FEMME

A MON FILS

A MA FAMILLE ET A MES AMIS

Témoignage de ma très vive affection.

Bien que cette thèse soit un travail de bactériologie, je n'oublie pas ce que je dois à mon Maître en Chimie, Monsieur le Professeur FOURNEAU et l'influence qu'il a eu sur ma formation scientifique.

Il m'est très agréable de lui exprimer ici toute ma reconnaissance et tous mes remerciements à la fois pour son enseignement et pour le très aimable accueil qu'il m'a réservé durant les deux séjours que j'ai effectués à son laboratoire en 1926-1927 et en 1939-1940.

Je remercie également Madame et Monsieur TRÉFOUËL des excellents conseils qu'ils m'ont prodigués et de leur extrême gentillesse à mon égard.

A MONSIEUR J. RÉGNIER

Professeur de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Paris

qui a bien voulu me guider par ses précieux conseils, m'encourager à l'exécution de ce travail et qui m'a fait le très grand honneur de présider le Jury de cette thèse.

Témoignage de profonde reconnaissance et de respectueux attachement.

A MONSIEUR M.-M. JANOT

Professeur de Pharmacie Galénique à la Faculté de Pharmacie
de Paris

A MONSIEUR VALETTE

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Paris

qui ont bien voulu faire partie du Jury de
cette thèse.

Hommage de respectueuse gratitude.

*Ce travail a été effectué au Service des Recherches
des Laboratoires ROBERT ET CARRIÈRE avec l'autori-
sation de Messieurs TABART et VARINOIS.*

*Qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de mes
vifs remerciements et de mon entier dévouement.*

AVANT-PROPOS

Le phénomène de la bactériophagie, au moment de sa découverte, pouvait paraître n'être qu'une action lytique semblable à celles que l'on avait déjà observées à plusieurs reprises chez les microbes. Ces actions avaient été bien étudiées ; on savait qu'elles étaient de nature diastasique et qu'elles s'épuisaient au fur et à mesure des passages.

La bactériophagie présentait sous ce rapport une grande différence : l'action lytique au lieu de s'affaiblir, était capable de se transmettre en série et devenait de plus en plus intense à la suite des passages. Il y avait là quelque chose d'entièrement nouveau : une régénération et une exaltation du pouvoir lytique au cours de la lyse.

Il convient de rendre hommage au mérite de d'HÉRELLE qui a vu, dès le début, l'intérêt considérable de ce phénomène et qui a établi, par une expérimentation rigoureuse, la plupart des faits importants qui s'y rapportent. D'HÉRELLE n'a d'ailleurs pas borné ses travaux à des expériences de laboratoire ; il a bientôt étendu son champ d'action au domaine thérapeutique dans lequel il a obtenu des résultats remarquables.

Peu après la découverte du bactériophage et les premiers travaux de d'HÉRELLE, un grand nombre d'expérimentateurs, tant français qu'étrangers, s'intéressèrent à la question et l'on peut dire qu'à l'heure actuelle, plusieurs milliers de mémoires y ont trait directement ou indirectement.

Depuis 1925, date de la publication par d'HÉRELLE de son 2³ livre, : « Le bactériophage et son comportement », qui constituait, à l'époque, une mise au point de la question, de nombreux progrès ont été faits dans l'étude de ce phénomène de lyse. L'intérêt des savants s'est porté sur le bactériophage lui-même dont on a étudié de plus près les propriétés et la nature ; sur le phénomène qu'il provoque, dont les modalités ont été précisées, sur les curieux phénomènes de mutation qui résultent de son action sur

certaines cellules microbiennes ; enfin, sur son rôle dans l'immunité et son importance dans la maladie.

Un compte rendu d'une partie de ces recherches a été donné par d'HÉRELLE dans son livre « Le phénomène de la Guérison dans les maladies infectieuses », publié en 1938.

Depuis plusieurs années, nous nous intéressons au bactériophage car nous pensons que son étude est à la base de tout travail bactériologique portant sur des espèces sensibles à son action. Nous signalerons plus loin les perturbations que sa présence — sans doute plus fréquente qu'on ne le croit — entraîne dans les propriétés générales des microbes.

Monsieur le Professeur RÉGNIER a bien voulu accepter de diriger nos travaux. Il désirait au début nous voir étudier la multiplication des principes lytiques anticoli en fonction de différents facteurs et en particulier du nombre de microbes mis à leur contact. Il fallait auparavant définir nos souches microbiennes et préparer les principes lytiques capables d'agir sur eux, ceci fait ; il fallait étudier les techniques de numération des bactériophages et, utilisant les méthodes de comptage des germes déjà mises au point par M. RÉGNIER et ses collaborateurs, procéder aux mesures nécessaires.

C'est d'après ces directives que nous avons commencé nos travaux un an avant la guerre.

Au cours de nos recherches, nous avons été amené à donner au chapitre relatif à la préparation des bactériophages anticoli, une ampleur plus grande que celle que nous désirions lui donner au début et, d'accord avec M. RÉGNIER, à supprimer la dernière partie du plan primitivement établi.

Pour être complet dans l'étude de la préparation des bactériophages, il ne fallait pas en effet se contenter d'envisager l'extraction des principes anticoli des milieux naturels ; il fallait aussi rechercher si, suivant l'opinion de certains auteurs, le bactériophage peut s'obtenir à partir des souches microbiennes elles-mêmes.

Ainsi qu'on le verra plus loin, nous avons pu obtenir d'une façon accidentelle du bactériophage anticoli à partir de certaines de nos souches et, dans ces cas, nous avons observé parallèlement l'apparition de formes rugueuses dans la culture microbienne traitée. Ce résultat nous a incité à étudier la transformation S — R et à envisager les rapports possibles entre la formation des variants rugueux et la mise en liberté des bactériophages.

Etant donné le caractère un peu spécial de la question et malgré les mises au point de d'HÉRELLE dont nous avons parlé plus

haut, nous avons crû utile de présenter, dans une introduction, une revue d'ensemble résumée, sur le phénomène de lyse transmissible.

Notre travail est donc divisé comme suit :

Une INTRODUCTION dans laquelle nous passons en revue les principaux faits connus relatifs à la question du bactériophage.

CHAPITRE I. — Relatif à la classification des germes du groupe coli :

- a) Exposé et discussion des classifications connues ;
- b) Caractères et classification de nos souches.

CHAPITRE II. — Extraction des bactériophages anticoli des milieux naturels :

- a) Sources de bactériophages anticoli ;
- b) Techniques connues d'obtention de ces bactériophages ;
- c) Travaux personnels.

CHAPITRE III. — Titrage des bactériophages anticoli.

1°) Par la méthode des dilutions :

- a) Travaux antérieurs ;
- b) Travaux personnels.

2°) Par la méthode des plages sur gélose.

- a) Travaux antérieurs ;
- b) Travaux personnels.

CHAPITRE IV. — Essais d'extraction du bactériophage anticoli à partir des souches microbiennes elles-mêmes :

- a) Travaux antérieurs ;
- b) Essais de vérification de ces travaux ; discussion.

CHAPITRE V. — 1°) La variation S — R :

- a) Travaux antérieurs ;
- b) Travaux personnels :
Caractères S — R de nos souches,
Réparation de quelques souches R.

2°) Le bactériophage dans ses rapports avec la variation S — R :

- a) Travaux antérieurs ;
- b) Travaux personnels.

CONCLUSION.

INTRODUCTION

Avant d'exposer les travaux qui font l'objet de cette thèse, nous avons cru bon de rappeler au lecteur les faits principaux relatifs aux connaissances actuelles sur le bactériophage et le phénomène qu'il provoque. Cette introduction comprendra d'abord un court chapitre sur l'histoire de la question ; nous exposerons ensuite brièvement comment se manifeste le phénomène sur milieux liquides et sur milieux solides. Après quelques lignes sur le mécanisme d'action nous aborderons les propriétés propres au bactériophage (1) ; nous ferons le parallèle entre les lyses bactériophagiques et les lyses par différents autres agents ; enfin, après avoir montré l'importance que présente le phénomène dans la maladie et son rôle dans l'immunité, nous terminerons en résumant les diverses conceptions relatives à la nature du bactériophage.

La découverte du Bactériophage.

Les premières communications relatives au bactériophage ont été faites par d'HÉRELLE en 1917, mais les observations qui ont mis ce savant sur la voie de ses admirables travaux sont antérieures à cette époque.

En 1908, d'HÉRELLE eut l'occasion de s'intéresser, au Mexique, à une épizootie sévissant sur les sauterelles et provoquant chez ces insectes une septicémie et des troubles diarrhéiques.

Le microbe pathogène fut isolé des déjections et l'examen microscopique montra un coccobacille dont les cultures étaient capables de produire la maladie chez des insectes bien portants.

Les sauterelles ou plutôt les larves aptères de cet insecte (criquet) causent dans certains pays tropicaux et subtropicaux des

(1) Pour la clarté des exposés qui vont suivre, nous avons indifféremment désigné le bactériophage par les termes de : Principe lytique, agent lytique ou corpuscule lytique.

ravages qui se manifestent par des pertes matérielles très importantes. Ces criquets sont d'une voracité extraordinaire et leurs bandes ravagent tout sur leur passage.

D'HÉRELLE, frappé par la mortalité considérable provoquée par l'épizootie du Mexique, eut l'idée, pour détruire ces insectes, de propager la maladie dans d'autres régions et il fut chargé par le gouvernement de la République Argentine d'une mission d'études dans ce but (1).

Ce savant fut donc amené à faire de très nombreuses cultures du coccobacille des sauterelles sur milieux artificiels et il observa que parfois ces cultures présentaient des irrégularités consistant principalement en des aires stériles situées sur la nappe microbienne sur gélose.

A cette époque, DORSCH et SCHWEINEITZ en Amérique, publiaient leurs travaux sur le hog-choléra et montraient que l'agent responsable de la maladie est, non le microbe jusque là mis en cause (bacille supestifer) décrit par SALMON en 1886, mais un virus filtrant.

D'HÉRELLE se demanda, par analogie, si l'agent véritable de la maladie des sauterelles était bien le coccobacille isolé ou s'il n'était pas un germe saprophyte supportant un virus invisible pathogène. Les zones stériles observées dans les cultures sur gélose auraient peut-être pu, dans ce dernier cas, s'expliquer par un antagonisme entre le virus invisible et le coccobacille.

Dans le but de vérifier l'exactitude de cette hypothèse, d'HÉRELLE injecta aux sauterelles des filtrats de culture qui, dans son esprit, devaient contenir l'ultravirus pathogène. Les résultats furent inconstants, mais, lorsque l'inoculation était positive (1), on retrouvait le coccobacille en abondance (2) dans les déjections des sauterelles malades.

Les expériences sur les sauterelles furent interrompues par la guerre de 1914 et leur auteur chercha à appliquer ses observations aux infections intestinales humaines (dysentérie bacillaire et fièvre typhoïde en particulier). Là encore il pensa à la possibilité d'un virus filtrant comme agent pathogène véritable. Il dut revenir sur cette idée en constatant l'absence de virulence des filtrats de selles de malades atteints de ces maladies et émit alors une nouvelle hypothèse suivant laquelle la présence des deux

(1) On s'explique maintenant que l'inoculation ait pu être quelquefois positive. Dans ces cas, le filtrat contenait du bactériophage peu virulent et des formes filtrantes du coccobacille.

(2) Le contenu intestinal de cet insecte est très pauvre en bactéries et quelquefois aseptique.

virus, visible et invisible, était nécessaire pour provoquer la maladie. Il chercha donc à infecter le cobaye et le lapin par des injections de filtrats de selles de dysentériques mélangés à des émulsions bactériennes.

Une fois, un tel mélange ayant été conservé à l'étuve avant l'injection à l'animal et ceci dans le but d'avoir un contact plus intime entre les deux virus, d'HÉRELLE constata que le mélange primitivement opaque était devenu complètement limpide ; les bacilles avaient complètement disparu.

Une étude faite en utilisant des filtrats de selles prélevées depuis le début de la maladie jusqu'à la convalescence montra que le phénomène de lyse des bacilles ne se produisait qu'au moment où le malade présentait une forte amélioration de son état et que dès lors la guérison arrivait rapidement.

Ce n'était donc pas un principe pathogène pour le malade qui était contenu dans les selles de convalescents de dysentérie, mais un principe dissolvant les bactéries.

En possession de ce principe, d'HÉRELLE put provoquer à volonté dans les cultures sur gélose de B. dysentérique les anomalies (plages stériles) qu'il avait observées dans certains cas sur les cultures de coccobacille des sauterelles.

La découverte du bactériophage était faite ; il restait à l'étudier ainsi que les modalités de son action. C'est à cette tâche difficile que d'HÉRELLE s'est consacré depuis plus de vingt ans et c'est surtout grâce à ses travaux si remarquables que nos connaissances sur ce sujet se sont de plus en plus précisées.

Le Phénomène de la Bactériophagie.

Nous venons de voir que le filtrat des selles de convalescents de dysentérie bacillaire, ajouté en petites quantités à une émulsion diluée de bacilles (200 millions par c.c.³) est capable de provoquer la lyse, c'est-à-dire la dissolution totale des germes.

Si nous prélevons une goutte du contenu du tube qui vient de subir la lyse et si nous l'introduisons dans une émulsion de microbes, nous constatons que le même phénomène se reproduit. On peut poursuivre ainsi l'expérience des milliers de fois sans que le principe lytique perde son activité ; bien au contraire, cette activité qui se manifeste extérieurement, nous l'avons dit, par l'éclaircissement du tube de bouillon, augmente peu à peu en rapidité au cours des premiers passages.

Il faut également admettre que le bactériophage, agent de la lyse, s'est multiplié, puisque l'action subsiste malgré les dilutions.

Le contenu d'un tube d'émulsion microbienne venant de subir la lyse dans les conditions décrites ci-dessus contient le principe lytique à une concentration extrêmement élevée. Ainsi, une goutte de ce lysat, ajoutée à 10 litres d'eau donne un liquide dont une seule goutte suffit pour provoquer la dissolution d'une émulsion microbienne en bouillon de même concentration que celle utilisée tout à l'heure.

Nous venons d'envisager la bactériophagie sur milieu liquide et nous avons souligné les deux faits importants suivants : l'action en série et la très grande concentration du principe actif dans les émulsions microbiennes dissoutes. Il est possible de mettre le phénomène en évidence d'une façon non moins nette en opérant sur gélose.

Reprenons en effet un tube contenant des bacilles lysés. Ajoutons une goutte du contenu de ce tube à un litre d'eau stérile puis étalons sur une gélose contenue dans une boîte de Pétri, à la fois une goutte de cette dilution et une goutte d'une culture de 12 heures à 37° de bacille de Shiga. Après 8 heures d'étuve nous observons une culture parsemée de petits trous circulaires de quelques millimètres de diamètre ; à la surface de ces trous ou plages la gélose apparaît nette de toute culture. Une boîte de Pétri témoin faite en remplaçant la goutte de dilution par de l'eau donne une nappe microbienne absolument normale.

Si en même temps qu'une goutte de culture en bouillon de B. Shiga nous avons étalé non plus une goutte mais deux de la même dilution de bactériophage, nous aurions obtenu deux fois plus de plages. C'est donc la présence du bactériophage qui est la cause de la production des plages et il existe un rapport direct entre leur nombre et la quantité de bactériophage ajouté.

Le fait que l'action bactériophagique se produit à certaines places et non à d'autres suggère l'idée qu'il se trouve non pas en solution mais sous forme d'une suspension dans le liquide. Là où un corpuscule est déposé sur la gélose, il manifeste son action à la fois en lysant les jeunes microbes qui sont autour de lui et en se multipliant.

On peut en effet vérifier aisément que chaque place en apparence stérile est constituée par une colonie de bactériophages. Il suffit de toucher une de ces plages avec un fil de platine flambé que l'on agite ensuite dans un tube de bouillon stérile ; les corpuscules entraînés par le fil s'émulsionnent dans le bouillon qui dès lors devient capable soit de provoquer à dose infime la lyse d'une émulsion microbienne en bouillon, soit de former des pla-

ges par dilution et ensemencement simultané sur gélose avec une culture de bacilles.

De l'étude du phénomène sur milieu solide, il ressort deux conclusions importantes : la nature corpusculaire du bactériophage et la formation de zones dénuées de culture ou plages.

Tous les microbes connus sont-ils capables de subir la bactériophagie ? On ne peut répondre encore à cette question, car il est des espèces microbiennes pour lesquelles on n'a pu isoler jusqu'ici de principe lytique actif — ceci ne veut d'ailleurs pas dire qu'on n'y parviendra pas. Quoi qu'il en soit, le fait qu'on possède des filtrats agissant sur des bactéries d'espèces microbiennes les plus variées, semble indiquer que le phénomène est général.

Les bactériophages les plus fréquents sont ceux qui agissent sur les microbes intestinaux de l'homme et des animaux. On obtient également très facilement des bactériophages contre staphylocoques. Enfin, il en existe contre des quantités de microbes : pneumocoque, streptocoque, pyocyanique..., contre certains bacilles sporulés (mégathérium subtilis, anthracis...) et même contre des microbes parasites des plantes : (*Rhizobium radicola* — *B. Tumefaciens*...).

La spécificité d'action est variable : certains bactériophages ont leur action limitée à une souche unique, d'autres à une seule espèce, d'autres enfin possèdent le pouvoir de lyser plus ou moins fortement des souches d'espèces éloignées.

Mécanisme d'action.

Le mécanisme du phénomène de la bactériophagie semble bien être celui indiqué par d'HÉRELLE en 1921. Il y aurait d'abord fixation des corpuscules bactériophages sur les microbes, pénétration à l'intérieur du corps bactérien, multiplication, enfin éclatement avec libération de corpuscules. Mentionnons seulement ici que les faits qui ont permis d'élaborer cette hypothèse ont été établis par des mesures du nombre de corpuscules présents au cours d'un phénomène de lyse. Les auteurs qui se sont attachés à cette question ont tous observé un premier stade de disparition presque totale du nombre des corpuscules présents dans l'émulsion bactérienne soumise à l'action du bactériophage. Ces corpuscules sont fixés sur les bactéries — la preuve en est donnée par leur présence dans ou sur les bactéries séparées par centrifugation.

La durée de cette fixation dépend d'une part de l'activité du principe lytique à l'égard de la bactérie et d'autre part des condi-

tions de l'expérience (milieu de culture, température, pH...) ; elle peut être de l'ordre d'une demi-heure.

Au bout d'un temps dépendant encore des mêmes facteurs (1 heure par exemple à 37°) il y a un accroissement brusque du nombre des corpuscules présents dans le liquide et disparition simultanée du nombre des bacilles.

L'examen microscopique a permis à ce stade d'observer un éclatement brusque des bactéries qui avaient au préalable subi un gonflement accusé.

Le bactériophage, ses propriétés.

Résumons ici très brièvement nos connaissances sur le bactériophage lui-même. Il présente, avons-nous dit, les caractères d'un corpuscule de dimension infime. Des mesures sérieuses basées sur le passage au travers de membranes graduées lui fixent un diamètre approximatif de 20 μ . Il s'agit là d'un ordre de grandeur car il existe des corpuscules de tailles différentes.

Ces dimensions lui permettent de traverser les bougies de porcelaine et le rendent invisibles.

A l'ultramicroscope on peut voir immédiatement après bactériophagie d'une bactérie une sorte de nuage légèrement illuminé. S'agit-il de corpuscules bactériophages ou de débris de bacilles non encore complètement dissous ? Nous ne pouvons le dire !

BECHHOLD et VILLA (2) ont purifié des bactériophages et leur ont fait adsorber des particules d'or colloïdal ; dans ces conditions ils ont pu les observer à l'ultramicroscope.

BORREL (3) par une technique spéciale de surcoloration pense avoir réussi à colorer les bactériophages qui se présenteraient sous forme d'amas de granulations.

BURNET (4) a pu observer des bactériophages par examen microscopique en lumière ultraviolette et un autre auteur, SCHLESINGER (5), aurait pu, lui aussi, observer sur fond noir et dénombrer les corpuscules lytiques cultivés sur milieu synthétique.

La nature chimique du bactériophage n'est pas connue d'une façon précise. Il a fallu d'abord purifier les préparations de bactériophage et les séparer des produits qu'ils peuvent avoir adsorbés. Ce problème, comparable à celui qui se pose pour la détermination chimique des diastases est des plus compliqués.

Certains caractères, tels que : floculation par le sulfate d'ammoniaque à saturation et par les acides, la présence d'azote et de phosphore, le pouvoir antigène, — permettent de penser qu'il

s'agirait d'une hétéroprotéine et peut-être d'une nucléoprotéine. NORTHROP (6) aurait isolé de cultures de staphylocoque, une protéine possédant les propriétés du bactériophage ; la préparation de cet auteur contient environ 1 % de sucre réducteur et de petites quantités de glucosamine.

Nous n'avons pas l'intention de passer ici en revue le détail des propriétés du bactériophage ; nous nous contenterons dans cette introduction de signaler l'action atténuante ou destructrice, suivant l'intensité et la durée, d'agents physiques tels que : radiation — chaleur — congélation et réchauffage — pression, etc... Certains antiseptiques agissent également sur les corpuscules lytiques pour les détruire ; ce sont les mêmes qui sont capables d'affecter les microbes. Remarquons toutefois que ces derniers sont généralement plus sensibles que les bactériophages à l'action des agents chimiques.

Nous allons maintenant dire quelques mots de deux propriétés biologiques importantes des corpuscules lytiques : leur activité ou virulence, suivant d'HERELLE, et leur pouvoir d'adaptation.

Lorsqu'on étudie la lyse d'une culture microbienne (250 millions par c.c.³) par des suspensions bactériophages d'origine différente et qui sont actifs vis-à-vis de cette culture, on remarque des différences importantes dans cette activité. Certaines sont capables de dissoudre les microbes promptement et définitivement ; d'autres n'apportent qu'un très faible éclaircissement ; d'autres enfin, ne produisent aucun effet immédiat. Ce degré dans l'activité est également lié au microbe attaqué et il peut arriver que tel bactériophage qui ne produit qu'un léger éclaircissement sur une souche microbienne déterminée, produise la lyse totale d'une autre souche. Dira-t-on que c'est parce que cette deuxième souche est plus sensible qu'elle a été plus activement attaquée ? Non, car certains autres bactériophages peuvent avoir un effet inverse et agir mieux sur la seconde que sur la première. Ainsi, l'activité de différents bactériophages est variable et celle d'un même bactériophage dépend de la souche à laquelle elle s'attaque.

Cette activité du principe lytique vis-à-vis d'un microbe déterminé est en rapport avec le taux de sa multiplication en un temps donné dans les conditions de milieu et de concentration microbienne convenable ; elle est comparable à la virulence d'une bactérie pathogène se développant dans un organisme étranger.

L'analogie va d'ailleurs plus loin et de même qu'une bactérie pathogène voit sa virulence exaltée par passages sur des individus

sensibles, de même l'activité du bactériophage augmente par passages sur des microbes sensibles à son action.

On sait aussi que divers moyens permettent d'abaisser la virulence d'une bactérie vis-à-vis d'un organisme qu'elle est capable de parasiter. Le parallélisme est encore complet ici et, par des moyens physiques ou chimiques appropriés, on peut atténuer un bactériophage et lui faire perdre partiellement son activité.

Lorsqu'une population est atteinte par une épidémie, certains individus résistent à l'infection ou, s'ils sont atteints, jugulent la maladie. Il en est de même des bactéries soumises à l'action du bactériophage : certaines sont plus spécialement douées pour l'acquisition de la résistance et arrivent à survivre ; elles sont dès lors immunisées contre ce bactériophage qui est désormais sans effet sur elles. Elles sont devenues capables de se développer malgré sa présence et constituent les cultures dites secondaires qui se forment après un éclaircissement passager causé par un principe lytique peu actif.

Ainsi, deux facteurs antagonistes s'opposent lorsqu'on met en présence le bactériophage et la bactérie ; ce sont d'une part le degré d'activité ou virulence du premier et la faculté de résistance de la seconde.

L'autre propriété biologique importante sur laquelle nous désirons attirer l'attention du lecteur consiste en la propriété qu'a le bactériophage de s'adapter à différentes conditions. Nous venons de voir qu'il est possible d'exalter la virulence des corpuscules par passages, il s'agit là d'une adaptation à l'attaque plus vive des cellules microbiennes.

Le bactériophage est aussi capable de s'adapter à divers facteurs nocifs tels que des agents chimiques (antiseptiques, acides ou alcalis du milieu, etc.), à des agents physiques (chaleur) ou biologiques (sérums antiphages).

L'adaptation se fait par les moyens habituels, c'est-à-dire en soumettant les corpuscules lytiques à l'action de concentrations croissantes du facteur nocif.

Une question se pose maintenant : Le phénomène de d'HÉRELLE est-il différent des lyses que subissent les microbes sous diverses influences et en quoi réside cette différence ?

Lyses non-bactériophagiques.

FLEMMING (7) a signalé en 1922 l'existence d'un principe bactériolytique se trouvant surtout dans le blanc d'œuf, mais aussi

dans d'autres tissus animaux et dans la plupart des sécrétions (crachats, mucus nasal, etc...). Le principe est inactif sur les microbes du groupe coli, typhi, dysentérie ; par contre, il agit sur la plupart des coccis se trouvant habituellement dans l'air et sur quelques bactéries saprophytes.

La sensibilité à la lumière, à la chaleur, aux acides et aux alcalis, l'adsorption par certains produits comme la lécithine, la production possible de souches résistantes, pourraient au premier abord permettre de confondre le lysosyme et le bactériophage. Deux différences fondamentales existent pourtant entre eux : le premier est un principe diastasique dont l'action s'épuise par passages successifs au contact des microbes, au lieu de se régénérer comme cela se produit avec le bactériophage. Le lysosyme s'attaque aussi aux microbes morts alors que le bactériophage exige des microbes vivants pour se reproduire et pour manifester son action.

Les cultures sporulées d'actinomycètes sont capables de produire des lysines actives sur certains microbes. De même, les *Streptothrix* dissolvent en quelques heures certains microbes pourvu que ceux-ci soient tués ou que leur multiplication soit enrayée. On remarquera qu'il s'agit là de conditions opposées à celles qui permettent l'action du bactériophage, celui-ci exigeant pour manifester son action lytique des microbes vivants et en voie de multiplication.

Les *Thyrothrix* isolés du fromage par DUCLAUX sont des lysobactéries qui dissolvent avec intensité un grand nombre de cultures mortes ou vivantes. Leur action n'est d'ailleurs pas limitée aux microbes puisqu'ils dissolvent la fibrine, la gélatine, le blanc d'œuf.

Le *B. Mésentéricus*, le *B. subtilis*, les levures, placés au contact des microbes dans un milieu contenant des sucres mais dépourvus de substances azotées, se procurent l'azote nécessaire à leur vie en digérant les microbes.

On connaît aussi l'action lytique de la pyocyanase, ferment sécrété par le *b. pyocyanique* ; l'autolyse anaérobie des staphylocoques réalisée par JALMAIN ; la lyse des pneumocoques par la bile ; la bactériolyse par les acides gras, etc... Cette énumération certainement incomplète montre que les agents capables de faire subir la lyse aux microbes sont nombreux. Ils agissent par la sécrétion d'une diastase ou par la stimulation des ferments autolytiques. Leur action ne peut être confondue avec la lyse bactériologique pour les mêmes raisons déjà signalées à propos du

lysosyme et dont la principale, nous le rappelons, est l'épuisement de l'action par passages successifs.

Le phénomène de Twort.

En 1915, c'est-à-dire deux ans avant la première communication de d'HÉRELLE sur le bactériophage, le bactériologue anglais TWORT a fait les remarques suivantes : En ensemençant sur gélose de la pulpe vaccinale de veau, on obtenait après une incubation de 24 heures à 37° une culture présentant des aires d'aspect aqueux. Certaines colonies de microcoques appartenant à cette culture ne pouvaient être repiquées et devenaient avec le temps vitreuses et transparentes. A l'examen microscopique, on observait de fins granules se colorant en rougeâtre par le Giemsa. Cette transformation vitreuse était par ailleurs susceptible de se propager à des colonies de staphylocoques normales ; il suffisait de les toucher avec un fragment de culture devenue transparente.

Ainsi, en résumé, le phénomène de TWORT présentait les caractères principaux suivants : aspect vitreux de la culture, transmissibilité, microbes transformés en granules impossibles à cultiver.

Ce phénomène est-il différent de la bactériophagie ? TWORT et avec lui d'autres auteurs ont soutenu que non ; d'HÉRELLE a estimé que les deux phénomènes sont différents et il a donné à celui observé par l'auteur anglais le nom de bactérioclasie, voulant montrer qu'il s'agissait là d'une fragmentation des cocci en granules et non d'une lyse totale des corps bactériens.

Dans son livre publié en 1926, d'HÉRELLE a longuement discuté l'expérience de TWORT. Il a cherché sans succès à obtenir la transformation vitreuse du staphylocoque par inoculation de bactériophages à des cultures de ce microbe.

Cette transformation avait pourtant été effectuée par GRATIA, puis plus tard vérifiée par FLU. Il est probable que l'échec de d'HÉRELLE tient au fait qu'il n'a pas expérimenté sur les mêmes bactériophages que GRATIA. On sait en effet maintenant que tous les bactériophages et en particulier ceux actifs sur le staphylocoque n'ont pas un comportement identique. Certains sont lents à se multiplier et forment sur gélose de très petites plages ; d'autres, par contre, plus rapides dans leur multiplication et doués du pouvoir de diffuser rapidement, donnent des plages plus larges qui peuvent s'étendre et produire la transformation vitreuse. C'est sans doute un de ceux-ci qui a produit le phénomène décrit par TWORT.

Le staphylocoque n'est pas le seul microbe sur lequel on

puisse l'observer ; PROCA, puis nous-mêmes, l'avons vu se manifester sur le colibacille.

Il semble bien acquis maintenant que la transformation vitreuse de TWORT et la bactériophagie de d'ILLÉRELLE représentent deux aspects du même phénomène.

*Importance du Bactériophage et du phénomène
qu'il provoque.*

Pour juger de l'importance d'un phénomène, il faut d'abord savoir s'il est général ou s'il ne s'applique qu'à quelques cas particuliers. Nous avons déjà signalé que si des bactériophages actifs contre certaines espèces microbiennes n'ont pu encore être isolés, la grande majorité de celles-ci est sensible à l'action des corpuscules lytiques agissant spécifiquement ou non sur elles.

La recherche des bactériophages a surtout été faite pour les microbes pathogènes en raison de l'intérêt thérapeutique qui s'ajoutait à leur découverte ; on en possède aussi qui agissent sur des espèces saprophytes et il est vraisemblable qu'une recherche systématique aboutirait à en augmenter le nombre. Vis-à-vis de certaines espèces il a pourtant été impossible d'obtenir aucun bactériophage actif ; d'ILLÉRELLE pense qu'elles sont constituées par une symbiose ancienne bactérie bactériophage, symbiose dans laquelle les deux êtres ont acquis l'un vis-à-vis de l'autre une résistance équilibrée.

Nous disions précédemment qu'il n'est pas possible pour le moment d'affirmer la généralité absolue de la bactériophagie ; on peut au moins dire qu'il s'agit d'un phénomène très vaste dont on sait dès maintenant qu'il se manifeste sur la plupart des espèces microbiennes pathogènes pour l'homme et les animaux.

Ainsi qu'on va le voir maintenant, le bactériophage joue un rôle important en biologie générale, bactériologie, immunologie, médecine. De plus, on a pu mettre son rôle en évidence, en agriculture, dans certains phénomènes de « fatigue des sols » et dans des maladies des plantes.

En biologie générale l'intérêt du bactériophage réside surtout dans sa nature. Si le principe lytique est vivant comme le pensent certains auteurs, l'unité vivante se trouve réduite à des proportions infimes, beaucoup plus petites que la cellule. Les dimensions impliquent une structure micellaire d'une grosseur de l'ordre de celle de la globuline sérique.

En bactériologie, en dehors du phénomène lytique qu'il provoque, l'importance du bactériophage est dominée par sa faculté

de produire des mutants. Chaque microbe comporte une multitude de caractères : morphologie, propriétés de la membrane, actions chimiques fermentatives, pouvoir hémolytique, agglutination, etc... qui, ainsi que nous allons le voir, peuvent être inhibés complètement, diminués ou exaltés par l'action du bactériophage.

Voici tout d'abord les conditions expérimentales qui permettent d'obtenir de tels mutants : on fait agir en bouillon une petite quantité de bactériophage très actif sur un microbe sensible ; après dissolution totale des germes, on répartit le lysat dans une vingtaine de tubes que l'on met en observation à la température du laboratoire. Au bout de quelque temps certains d'entre eux se troublent légèrement ; il suffit alors d'étaler sur gélose les germes de cette culture pour obtenir des colonies de mutants du germe original.

Au cours de nos expériences nous avons aussi observé la formation de mutants sur les aires stériles après bactériophagie sur gélose. Il suffit d'abandonner les boîtes de Pétri, ayant servi à cet usage, pendant plusieurs jours à la température du laboratoire pour observer l'apparition de colonies d'aspect et de caractères différents.

Une étude complète des mutants du vibron cholérique a été faite par d'HÉRELLE et ses collaborateurs. Ces expérimentateurs ont observé dans ce cas des modifications morphologiques importantes se traduisant par l'apparition de formes en cocci et en bacilles ; ils ont vu aussi des variations de la mobilité qui est généralement diminuée ou annulée ; les réactions de fermentations sur divers sucres, la réaction indol-nitreuse, le pouvoir hémolytique et les réactions d'agglutination subissent également des variations importantes.

D'autres fois, et c'est le cas des bacilles du groupe coli, le bactériophage amène la formation de cultures muqueuses. Le fait a été observé d'abord par d'HÉRELLE puis par BORDET et CIUCA et par GRATIA. Plus récemment, GORY l'a mis en évidence par l'action des filtrats d'eaux d'égoûts sur des bacilles coli ; il est vraisemblable que ces eaux agissent par les bactériophages qu'elles contiennent.

Voici ce qu'écrit BORDET (8) sur la formation des souches muqueuses :

« Sur gélose, les émulsions lysées de ce microbe (l'auteur part du *B. coli*) donnent souvent des cultures filantes, muqueuses ; les microbes semblent enrobés dans un épais mucilage et ce caractère se maintient dans les repiquages successifs.

« Ces mutants muqueux ont les caractères du bacille de FRIEDLAENDER. »

D'autres auteurs ont étudié, quoique d'une façon moins complète, certains mutants obtenus à partir d'autres espèces microbiennes : staphylocoques, proteus, etc... Ils se sont généralement attachés à la variation d'un seul caractère. C'est ainsi qu'on a observé la perte du pigment jaune du staphylocoque aureus chez certains mutants de ce microbe et que l'on a pu, dans le cas du Proteus, provoquer par le même moyen la naissance de colonies pigmentées en jaune (FEIGIN, 1925).

Les caractères sérologiques subissent, avons-nous dit, chez les mutants des variations souvent importantes. En dehors de d'HÉRELLE, TOYODA (9) a étudié les aspects morphologiques et sérologiques des mutants du bacille de GAERTNER. BRILL (10) opérant sur du coli a vu que l'addition du bactériophage à une culture la rend beaucoup plus agglutinable par le sérum spécifique.

SONNENSCHN (11) a démontré que le bacille typhique est hémolytique après contact avec le bactériophage et que, dans le cas de ce microbe, toutes les cultures hémolytiques sont lyso-gènes.

D'autres observations ont été faites, relatives à la perte de la propriété de liquéfier la gélatine, perte ou acquisition de flagelles.

Les faits ci-dessus donnent une explication plausible des variations de caractères que l'on observe parfois dans les laboratoires sur certaines souches de collections. Il s'agit peut-être de souches mixtes bactéries-bactériophages chez lesquelles le principe lytique a engendré une mutation se manifestant par la modification brusque d'un caractère ou l'apparition d'un autre.

Ces modifications se produisent vraisemblablement dans les milieux naturels où les microbes se trouvent un jour ou l'autre en contact avec un bactériophage qui agit sur eux. Ce sont sans doute elles qui sont à l'origine de cette variété de types microbiens que l'on trouve dans une même espèce et que l'on classe groupe, sous-groupe et genre.

Le bactériophage joue aussi un rôle très important dans l'immunité; ce fait est apparu à d'HÉRELLE et à d'autres à la fois par des essais *in vitro* et par des examens chez les malades atteints de maladies infectieuses.

Voyons d'abord ce premier point.

Le bactériophage agit *in vitro* de trois façons possibles suivant son activité à l'égard du microbe : s'il est très actif la lyse est totale, le microbe est détruit; s'il est peu actif les microbes

ne sont pas influencés dans leur développement, mais acquièrent une certaine résistance vis-à-vis du bactériophage qui est probablement détruit. Si le principe lytique est seulement moyennement actif, il est fixé par la bactérie et conduit à des cultures mixtes bactéries-bactériophages qui engendrent des mutants ainsi que nous l'avons exposé plus haut.

Ces mutants, en dehors des modifications de caractères déjà signalées, possèdent une virulence différente de celle de la souche initiale ; virulence généralement plus faible. Parfois même, comme dans le cas du vibrion cholérique, ils sont totalement avirulents (d'HÉRELLE). Ils peuvent aussi provoquer chez l'animal une maladie chronique alors que la souche initiale engendrait une maladie rapidement mortelle (d'HÉRELLE).

En dehors de cette modification de la virulence, les variations de l'agglutinabilité que nous avons déjà signalées intéressent aussi l'immunologie. Nous savons que certaines souches mutantes deviennent hyperagglutinables, alors que d'autres ne peuvent plus être agglutinées.

La sensibilité à l'action bactéricide de l'alexine est modifiée de la même façon : certaines souches, porteuses de bactériophages, devenant particulièrement sensibles à l'alexine, alors que d'autres, au contraire, ne subissent plus son action même après contact avec l'antisérum spécifique.

Les recherches de HODER (12) faites sur les bacilles typhiques, dysentériques et colis, confirmant celles de d'HÉRELLE, ont montré que la phagocytose des souches mutantes est favorisée par les ferments lytiques sécrétés par le bactériophage (1) — ferments doués d'un fort pouvoir opsonique. MAC NEAL (13) a confirmé ces résultats sur le staphylocoque.

Enfin, la toxicité de certaines endotoxines (endotoxine de SHIGA) est réduite à néant lorsqu'elles sont soumises à l'action des lysines sécrétées par le bactériophage.

Les faits que nous venons de citer montrent que les réactions d'immunité d'un organisme vis-à-vis des microbes infectieux dépendent dans une large mesure, de la présence ou de l'absence de bactériophages spécifiques intervenant comme troisième facteur.

Le rôle du bactériophage ne se borne pas là ; par son pouvoir de lyser le microbe, il met en liberté des substances solubles qui se sont révélées, dans certains cas, des antigènes très actifs, capables de conférer une immunité très puissante après un cer-

(1) Certains bactériophages sécrètent des substances lytiques de nature diastatique qui ont été mises en évidence par SERTIE.

tain temps d'incubation [d'HÉRELLE, confirmé par ARLOING, JOSURAND et NAHRUM (14)]. Cette activité antigénique particulière des lysats bactériophagiques ne paraît cependant pas constante et n'a pu être observée par tous les expérimentateurs [KENDRICK (15)].

Il est possible qu'elle soit liée à un état physico-chimique particulièrement favorable, cet état étant fonction lui-même du degré de clivage des constitutants des cellules microbiennes.

D'HÉRELLE, en collaboration avec MALCOLM et LAHÈRE, étudiant le choléra à l'hôpital de Calcutta, ont pu préciser l'importance des principes lytiques dans la maladie.

Ces expérimentateurs ont suivi chez leurs malades l'apparition des bactériophages anticholériques au cours de l'infection. Ils ont pu constater les faits suivants : Si un bactériophage actif ne se trouve pas dans l'intestin du malade au cours des 48 premières heures, le malade meurt invariablement. Si un bactériophage de faible activité apparaît, la maladie est prolongée et le malade guérit ou meurt suivant que l'activité du corpuscule lytique s'accroît ou diminue.

Les mêmes faits ont été observés par d'HÉRELLE dans la dysentérie bacillaire, la fièvre typhoïde ainsi que dans des maladies infectieuses sévissant sur les animaux.

Pour terminer ce bref compte rendu sur le rôle du bactériophage dans l'immunité, signalons la présence possible d'une propriété antibactériophagique dans les humeurs de l'organisme. On a pu en provoquer l'apparition par des injections répétées de bactériophages à des animaux. Le sérum de ceux-ci possède alors la propriété d'inhiber les principes lytiques de même nature qui deviennent incapable de manifester leur action.

Cette propriété antibactériophage existe à l'état naturel chez certains malades atteints de maladies chroniques ou à répétitions. Elle semble jouer un rôle important dans les staphylococcies et les colibacillooses qu'elle rend particulièrement rebelles dans certains cas. Il est nécessaire d'en tenir compte dans l'application de la thérapeutique par le bactériophage dont nous allons dire maintenant quelques mots.

Les résultats les plus remarquables ont été obtenus dans le traitement du choléra asiatique par d'HÉRELLE, MORISSON et RUSSEL. Cette thérapeutique a été mise en œuvre, au début par d'HÉRELLE ; depuis, de nombreux cliniciens l'ont utilisée avec des résultats souvent très bons, parfois inespérés.

La valeur du principe lytique employé est d'une très grande importance et explique les échecs obtenus par certains auteurs qui ont mis en œuvre des bactériophages trop peu actifs.

La précocité du traitement conditionne également le succès de cette thérapeutique — comme d'ailleurs de toute autre. Il est évident que lorsque des lésions graves se sont installées, une thérapeutique détruisant l'agent infectieux causal, peut être insuffisante pour amener la guérison.

Pour souligner l'importance du bactériophage en médecine, nous allons énumérer les maladies infectieuses chez lesquelles le principe lytique a donné les meilleurs résultats.

Citons d'abord le choléra asiatique dont nous venons de parler. La peste, traitée avec succès par DERAMBO à Suez, et COUVY à Dakar ; la dysentérie bacillaire, maladie pour laquelle cette thérapeutique a donné des résultats particulièrement brillants.

Les infections à staphylocoques, streptocoques, ont été particulièrement étudiées en France par RAIGA (furunculose, anthrax, phlegmon, méningite, septicémie...) et pour finir les maladies à colibacilles, *B. typhique* ou à germes voisins.

En agriculture, le bactériophage explique le phénomène de la fatigue des sols cultivés en luzerne. On sait que cette plante vit en symbiose avec le bacille radicolica ; or, plusieurs expérimentateurs ont montré que l'on trouve dans les nodosités des légumineuses un principe déterminant la lyse transmissible du *B. radicolica*. DEMOLON et DUNEZ (16) ont cherché et caractérisé le bactériophage dans la plante puis dans le sol des luzernières ; ils n'en ont pas trouvé dans les jeunes plantations, alors qu'il en existe dans les vieilles et spécialement au contact des racines ou des radicelles. Le bactériophage formé dans la plante passe donc dans le sol, soit qu'il y exsude directement, soit qu'il se libère par la décomposition des racines. Les auteurs cités ont montré que tant que la plante peut développer ses racines en profondeur, elle peut former de nouvelles nodosités et fixer de l'azote. Cette situation cesse lorsque le bactériophage a diffusé dans toute la masse de terre où les racines peuvent se développer. A partir de ce moment il n'y a plus de symbiose bactérienne et la plante perd sa puissance végétative.

Il y a plus, l'inoculation de la graine par une culture virulente de *B. radicolica* a permis la culture de la luzerne dans des régions où elle échouait jusque-là.

Il est possible de penser qu'il y a dans ce domaine d'autres résultats possibles. Peut-être l'inoculation à ces mêmes graines de souches rendues artificiellement très résistantes au bactériophage permettrait-elle d'éviter cette fatigue des sols et d'obtenir des cultures plus vigoureuses de luzerne.

Le bactériophage intervient aussi dans la guérison de certaines infections des plantes. A cet égard, une maladie connue sous le nom de pourriture humide, s'attaquant à de nombreuses plantes cultivées et en particulier à la carotte, a été étudiée par COONS et KOTILA en 1925. Ces auteurs ont pu isoler des carottes malades, un bactériophage virulent à la fois pour le *B. carotivorus* agent de la pourriture humide, pour le *B. atrosepticus* qui produit la pourriture noire de la pomme de terre et pour le bacille responsable des tumeurs des plantes. Ce bactériophage est capable d'agir préventivement et curativement sur les infections citées, en détruisant ou en rendant inoffensifs les germes responsables.

Il est vraisemblable que d'autres maladies des plantes doivent être justiciables de cette thérapeutique; il y a là un champ d'expérience qui, si l'on en juge par les premiers travaux dont nous venons de parler, peut aboutir à des résultats féconds.

Nature du bactériophage.

Depuis la découverte du bactériophage et les premiers travaux de d'HÉRELLE plusieurs questions se sont posées à tous les chercheurs: Qu'est-ce que le bactériophage, quelle est son origine, comment agit-il sur les bactéries? Des hypothèses se sont fait jour et des centaines de mémoires ont été consacrés à ce sujet; chacun apportant un ou plusieurs arguments en faveur de l'hypothèse choisie.

Malgré tous ces travaux, la question n'est pas encore résolue et les savants discutent toujours à ce sujet.

Nous n'avons pas l'intention de trancher ici cette question; ce que nous voulons faire c'est exposer les principales hypothèses actuellement retenues et indiquer les arguments nous paraissant avoir le plus de valeur, qui ont été invoqués pour ou contre chacune d'elle.

L'hypothèse la plus généralement admise est celle de d'HÉRELLE. Rappelons que pour cet auteur, le bactériophage est un parasite vivant, indépendant de la bactérie, capable de se fixer sur elle puis de se multiplier à ses dépens en produisant simultanément sa dissolution.

La plupart des faits observés concordent très bien avec cette hypothèse ainsi que nous allons le voir.

Mais avant tout, quelles sont les propriétés qui définissent un être vivant? Pour d'HÉRELLE un être vivant est caractérisé d'abord par sa faculté d'assimilation en milieu hétérogène. Le grossissement d'un cristal dans une solution sursaturée ne permet pas de dire que le cristal est vivant, car il grossit en milieu homo-

gène ; par contre, le développement d'une culture microbienne dans un tube de bouillon constitue un phénomène vital, car il y a assimilation par le microbe de la substance contenue dans le bouillon et transformation en sa propre substance.

D'autres propriétés caractérisent aussi l'être vivant : La persistance chez les descendants des caractères biologiques est une de celles-là. Ces propriétés sont bien possédées par les différentes lignées de bactériophages qui ont une spécificité d'action reconnue par tous les auteurs, des propriétés antigéniques qui leurs sont propres, un comportement spécial à chacune d'elles dans ses rapports avec le microbe qu'elle peut attaquer.

L'adaptation aux agents physiques, chimiques et biologiques constitue aussi un critérium de l'être vivant. Une foule de travaux ont montré que là encore le principe lytique se comporte comme tel et est capable de s'adapter progressivement aux agents les plus variés.

De nouveaux arguments sont venus ces dernières années compléter ceux déjà énumérés. L'assimilation par un être vivant d'une substance avec laquelle il va constituer ses tissus se fait ordinairement par l'intermédiaire de ferments chimiques (diastases). Le bactériophage, parasite vivant, se nourrissant de bactéries, devrait donc sécréter de tels ferments. Ceux-ci ont en effet été mis en évidence d'abord par d'HÉRELLE et ELIAVA, puis par SERTIC qui est même parvenu à les extraire. Ces lysines sont entièrement différentes des bactériophages ; elles présentent les propriétés des diastases et en particulier agissent proportionnellement à la quantité mise en œuvre. On a pu objecter que ces ferments sont peut-être produits par le microbe ; si cela était, les lysines résultant de l'action de différents bactériophages sur un même microbe devraient être identiques ; or, SERTIC et BULGAKOW ont montré qu'il n'en est rien et que certains caractères comme la thermorésistance varie de l'une à l'autre.

La théorie de d'HÉRELLE n'a pas rallié tous les suffrages, certains points n'ayant pu être expliqués par cette conception. On sait par exemple que les bactériophages ont besoin pour leur multiplication de bactéries en train de se reproduire ; le seul fait d'être vivant ne suffit pas. On imagine mal pourquoi un parasite exigerait de son hôte qu'il se reproduise, pour se reproduire lui-même.

Autre point : Les lysines décrites par SERTIC et dont nous venons de parler ne paraissent pas être sécrétées par tous les bactériophages ; ce ne serait que quelques « races » qui pourraient les produire. Il est possible de répondre que toutes les lysines ne

sont peut-être pas aussi diffusibles que celles étudiées par SERTIF et que d'autres moyens d'investigation plus sensibles les mettraient en évidence.

Contre l'hypothèse de d'HERELLE on a invoqué également la résistance des principes lysiques à la conservation et à certains antiseptiques tels que le bichlorure de mercure au millième. Il est certain que l'on n'est pas habitué à voir les organismes vivants résister à cet antiseptique.

Un autre fait important a été invoqué contre la théorie de l'être vivant étranger à la bactérie : Certains auteurs ont prétendu être parvenus à obtenir par divers traitements du bactériophage à partir de bactéries normales. Au cours de ce travail, nous avons répété leurs expériences, mais nous n'avons pu vérifier leurs résultats de façon régulière.

Voyons maintenant les faits invoqués en faveur d'une autre conception d'après laquelle le bactériophage serait une diastase ou un constituant d'un système diastasique.

C'est TWORT qui le premier a émis l'hypothèse d'un ferment qui se reproduirait au cours de son action. Plusieurs auteurs ont ensuite avancé que le principe lytique pourrait être une autolysine normale, résultant d'une exagération d'un processus physiologique normal se produisant sous l'influence de causes déchaînantes diverses. Le phénomène une fois déclenché et l'autolysine libérée, il pourrait se poursuivre indéfiniment.

Cependant le phénomène d'autolyse normale est un phénomène lent ; il ne se fait jamais sur des cultures jeunes mais au contraire s'observe sur des cultures âgées ; enfin, il n'aboutit jamais à la clarification totale des cultures. La lyse transmissible s'opère au contraire sur des cultures jeunes et amène rapidement leur clarification totale.

La théorie distasique a été reprise avec quelques variantes par KABESHIMA, GILDEMEISTER, OTTO, DOERR et dans une certaine mesure par BORDET et ses collaborateurs.

Ce dernier auteur a souligné l'analogie possible avec le phénomène bien connu maintenant de la formation du ferment de la coagulation du sang : la thrombase. On sait que l'un des facteurs constitutifs de cette diastase, le sérozyme, se trouve dans le plasma sous une forme inactive, le prosérozyme. Au cours de son action coagulante la thrombase a le pouvoir de transformer le prosérozyme en sérozyme prêt à s'unir avec l'autre constituant, le cytozyme pour la reproduction de la thrombase.

La découverte de STANLEY, effectuée en 1935, relative au virus protéine de la mosaïque du tabac a apporté un élément nouveau

à la question et montré que l'hypothèse d'un ferment se formant par autocatalyse n'est peut-être pas à rejeter. Cet auteur a isolé à l'état cristallisé une protéine nécessitant pour sa propagation et sa multiplication la présence de cellules vivantes sensibles.

Les résultats obtenus récemment par NORTHROP présentent aussi à ce point de vue un très grand intérêt. Cet auteur est parvenu à préparer à partir d'un lysat bactériophagique de staphylocoques une protéine possédant la propriété de déclencher la lyse transmissible à la dilution 10^{-10} mmg.

WOLLMANN apporte une autre hypothèse et considère que les résultats acquis ne peuvent s'expliquer qu'en admettant l'origine cellulaire des bactériophages. Il a formulé une théorie dite des facteurs héréditaires qu'il définit comme suit :

« Pour nous, il s'agit d'une variation mendélienne en ce sens
« qu'elle est liée à l'existence de certains territoires ou parcelles
« protoplasmiques. Les territoires de protoplasma bactérien sont
« les supports matériels ou les facteurs (dans le sens mendélien)
« de la variation envisagée. Ils déterminent cette variation (ten-
« dance à la lyse) chaque fois qu'ils apparaissent dans une cellule,
« que cela soit par une altération spontanée de sa constitution,
« par passage de la cellule-mère altérée aux cellules filles ou
« même — et c'est la particularité nouvelle des phénomènes qui
« nous occupent — qu'ils pénètrent du dehors ayant été mis
« en liberté dans le milieu extérieur par les cellules atteintes.
« Ce sont ces supports matériels ou facteurs héréditaires, parti-
« culièrement stables, qui constituent les bactériophages ou prin-
« cipes lytiques. »

L'existence de ces facteurs héréditaires ou gènes a été mise en évidence chez les organismes supérieurs, mais rien de pareil n'a été jusqu'ici observé chez les êtres inférieurs et BORDET et RENAUX se sont demandés s'il est possible d'étendre aux bactéries cette notion de facteurs héréditaires.

Mentionnons maintenant l'hypothèse émise par HADLEY. Pour lui les bactéries ne sont pas monomorphiques mais subissent de larges variations à caractère cyclique. Dans la reproduction du microbe il y aurait une phase invisible dont les éléments seraient constitués par des cellules très petites se trouvant dans un état cyclogénique différent des cellules normales. Dans ces conditions, une plage se formant sur une culture microbienne faite sur gélose constituerait une zone de transformation morphologique.

Comment expliquer d'après cette théorie que les « colonies

lytiques » ne sont pas observées plus souvent dans les cultures microbiennes normales ? HADLEY admet qu'un stimulant de la croissance est nécessaire pour produire la phase invisible. Cette façon de voir est basée sur les travaux de EDERLEIN qui a observé les phases cycliques de la vie microbienne se manifestant par des aspects morphologiques différents. Beaucoup d'auteurs estiment que les formes observées sont en réalité des formes de dégénérescence et considèrent les vues d'EDERLEIN encore insuffisamment établies.

Indiquons encore les conclusions de PROCA qui admet que les phénomènes de bactériophagie sont dus à des produits bactériens de nature hormonale dont l'élaboration serait liée à un mode de reproduction des bactéries comportant une conjugaison autogamique (zygose).

Là encore on peut objecter que l'évidence d'une telle conjugaison n'a pas encore été établie.

Ainsi que nous l'avons déjà dit, il est difficile actuellement de faire un choix définitif parmi toutes ces conceptions. Cependant, nous voudrions, pour finir, signaler un fait important favorable à la théorie de d'HÉRELLE, fait qui résulte de l'observation toute récente de bactériophages au microscope électronique.

Des auteurs allemands ont pu constater que les bactériophages ne se présentent pas, comme on l'avait cru jusque-là, sous forme de globules sphériques mais qu'ils sont constitués par une tête globuleuse munie d'une sorte de flagelle. Il est certain que l'existence d'une structure constitue un argument en faveur du bactériophage être vivant ; mais certains font déjà observer qu'il est possible que de grosses molécules protéiques se présentent de la même façon au moyen du microscope électronique.

Il est vraisemblable que les recherches sur les virus qui se poursuivent actuellement apporteront quelques lumières sur la véritable nature des bactériophages.

CHAPITRE PREMIER

CLASSIFICATION DES MICROBES DU GROUPE COLI

A. — EXPOSÉ ET DISCUSSION DES CLASSIFICATIONS CONNUES

Ce travail a été fait, ainsi que l'indique son titre, sur des microbes du groupe Coli. Il s'agit là, le fait est bien connu, d'un groupe essentiellement hétérogène, c'est-à-dire dont les différents types présentent entre eux des variations parfois assez considérables.

Tous les caractères qui permettent de classer les microbes : caractères morphologiques, biologiques, sérologiques, montrent qu'il existe une série d'intermédiaires entre les souches les plus typiques et celles qui le sont le moins ; il semble bien qu'en employant un grand nombre de réactifs, on arriverait à un nombre très élevé de sous-groupes.

On conçoit que les expérimentateurs qui se sont attachés à réaliser une classification des microbes de ce groupe aient eu une tâche difficile et ne soient pas toujours arrivés à concilier leurs points de vue.

Nous avons cherché, dans la première partie de cette étude, à exposer les différentes classifications proposées et, nous inspirant de ces travaux, nous avons défini les caractères des microbes qui ont servi à nos essais.

I. — *Caractères généraux.*

Les microorganismes du groupe Coli comprennent de nombreuses bactéries gram négatif que l'on rencontre toujours dans l'intestin et dans les fèces de l'homme et des animaux, mais qui se trouvent aussi par contamination dans l'eau, le lait et le sol.

Nous allons mentionner tout d'abord les caractères fondamentaux de ces microbes ; nous verrons au fur et à mesure de l'exposé des travaux de classification, les différences qui existent entre les diverses variétés de ce groupe.

Ce sont des bâtonnets d'une longueur moyenne de 1 à 2 μ ; on en observe pourtant de 0,5 μ au minimum et de 5 μ au maximum. Les formes courtes se trouvent plutôt dans les tissus et dans les

fèces. La largeur est généralement de 0,4 à 0,6 μ , mais elle peut varier avec la composition du milieu.

Dans certains cas et avec quelques types, on peut observer la forme filamenteuse ; c'est ainsi qu'on peut parfois trouver dans des urines infectées des éléments en forme de filaments plus ou moins longs. Dans les milieux artificiels, l'addition d'urée par exemple peut provoquer la formation de fils de 120 μ de longueur en moyenne.

Certains organismes du groupe Coli sont munis de 4 à 8 flagelles péritriches et sont par conséquent mobiles. D'autres sont immobiles et spécialement les variétés encapsulées. Ajoutons que ces microorganismes sont asporulés, qu'ils sont aérobies ou facultativement anaérobies, enfin qu'ils donnent sur les milieux de culture ordinaires à 37° ou à la température du laboratoire une pousse généralement profuse.

Le lactose et le glucose sont fermentés avec production de gaz ; et il y a formation d'indol par culture en eau peptonée. La gélatine n'est pas liquéfiée après 24 heures ; enfin, certaines couleurs telles que l'indigo, le bleu de méthylène, le rouge neutre, etc..., sont réduites et décolorées par les cultures anaérobies de ces germes.

Les caractères fondamentaux ainsi définis sont résumés dans le tableau ci-dessous ; nous donnons également ceux présentés par les groupes voisins.

TABLEAU I

GROUPES	MOBILITÉ	LACTOSE	GLUCOSE	MANNITE	GÉLATINE liquéfiée après 24 h.	Production d'H ₂ S	Production d'Indol	Décoloration du rouge neutre	
Coli	O ou +	Acide et gaz	Acide et gaz	Acide et gaz	O	O	+	+	
Proteus,.....	+ envahissem ^t des milieux solides	O	Acide		+	+	+		
Typhique.....	+	O	Acide	Acide	O	+	O	O	
Paratyphique	A..	+	O	Acide et gaz	Acide et gaz	O	O	O	+
	B..	+ seulem ^t si cult. jeunes	O	Acide et gaz	Acide et gaz	O	+	+	+
Dysentérique	Shiga..	O	O	Acide	O	O	O		
	Fleynes.	O	O	Acide	Acide	O	O	+	
	Hin. . .	O	O	Acide	Acide	O	O	+	

II. — *Classifications dans le groupe Coli.*

Les premières études sur le groupe Coli furent faites en 1895 par ESCHERICH (17). Cet auteur qui étudiait la flore des fèces de nouveaux-nés constata, à partir du moment où ces enfants étaient alimentés par le lait maternel, l'apparition d'un bacille qu'il nomma Coli communis. Il fit l'étude du microbe et en 1886 il découvrit un deuxième élément obligatoire des fèces qu'il nomma B. lactis aérogenes.

Par la suite, différents types furent isolés des fèces, du lait, de l'eau, et les expérimentateurs cherchèrent les moyens de les différencier les uns des autres ; un certain nombre d'observations furent ainsi publiées.

Théobald SMITH (18) remarqua la tendance à former une capsule des bactéries lactis aérogenes de ESCHERICH. Il constata que certaines souches fermentaient le saccharose, alors que d'autres ne le faisaient pas ; enfin, il imagina un moyen de distinguer ces microbes par appréciation de la quantité de gaz fourni lors de la fermentation de glucose.

HARDEN et WALPOL en 1906 étudièrent la fermentation du glucose par le bacille lactis aérogenes et par le coli et trouvèrent que le premier produisait de l'acétyl-méthyl-carbinol capable de donner la réaction décrite par VOGES et PROSKAUER en 1898 (19) (coloration rose après addition d'alcali). Nous reviendrons plus loin sur cette importante réaction.

DURHAM (20) remarqua que le bacille lactique aérogenes se distingue du bacille coli, d'une part par sa faculté de fermenter l'amidon ou l'inuline, d'autre part par le fait qu'il produit la réaction de VOGES et PROSKAUER.

Ce n'est qu'en 1905 et 1908 avec les travaux de MAC CONKEY (21) et (22) que les premières tentatives sérieuses de classification des bactéries du groupe Coli se firent jour. Cet auteur, se basant sur quelques tests biologiques tels que : réaction de VOGES-PROSKAUER, fermentation de glucose, saccharose et dulcité, parvint à les diviser en quatre sous-groupes :

SOUS-GROUPE	DULCITE	SACCHAROSE
Coli communis	+	—
Coli communior	+	+
Lactis aérogenes	—	+
B. acidi lactici	—	—

qu'il scinda eux-mêmes en un certain nombre de variétés en utilisant des caractères tels que la liquéfaction de la gélatine, la production d'indol, la mobilité. L'ensemble permettait la différenciation de 128 types. L'auteur put en caractériser 36 parmi 497 souches isolées de différentes sources.

Les années suivantes, plusieurs auteurs dont BERGEY et DUHAN (23), JACKSON (24) utilisèrent cette classification après quelques modifications. C'est ainsi que JACKSON faisait intervenir la fermentation du raffinose et de la mannite.

Après ces essais, les travaux sur la question deviennent plus nombreux :

HOWE (25) étudie 630 souches de *B. coli* obtenues à partir de fèces humaines ; il n'envisage que deux sous-groupes : *B. coli communis* (saccharose négatif) et *B. coli communior* (saccharose positif).

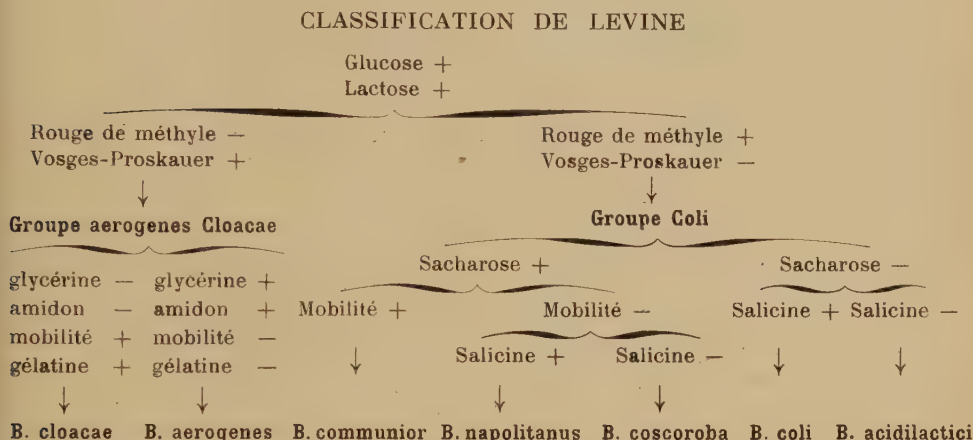
KLIGLER (26) apporte une contribution intéressante en soulignant le rapport qui existe entre la réaction de VOGES-PROSKAUER, la production de l'indol, la non-liquéfaction de la gélatine et la fermentation du saccharose et de la salicine. Il propose donc d'ajouter ce dernier test à la classification de MAC CONKEY.

Les investigateurs s'efforcent alors de plus en plus de découvrir les corrélations existant entre les différents caractères afin de ne conserver que les plus importants et de simplifier la classification. Travaillant dans ce sens, ROGERS et collaborateurs (27), puis CLARK et LUBS (28) reprennent la question des gaz produits par les différents organismes voisins du *Coli* au cours de leur action fermentative sur les hydrates de carbone et montrent qu'il y a parallélisme entre le rapport $\frac{\text{CO}_2}{\text{H}_2}$ et l'acidité développée dans le milieu. Notons que ce rapport avait déjà été mentionné par plusieurs auteurs : SMITH, RUSSEL et BASSETT, DE HARDEN, etc..., comme base de différenciation ; pratiquement, la notion d'acidité était beaucoup plus facile à apprécier et les auteurs cités introduisirent dans ce but le test au rouge de méthyle. Rappelons que ce colorant jaune en milieu neutre ou très légèrement acide, vire au rouge pour une acidité un peu notable.

Plusieurs autres expérimentateurs : LEVINE (29) et (30), (31) et (35), JOHNSON (32), HULTON (33), JOHNSON et COLES (34), poursuivant les études relatives aux corrélations entre les diverses réactions biologiques, signalent le fait à peu près constant de l'opposition entre la réaction de VOGES-PROSKAUER et celle au rouge de méthyle : Lorsque l'une est positive, l'autre est négative et inversement. LEVINE, au cours d'un travail publié en 1918, rassemble les résultats connus et élabore une classification dans

laquelle il distingue deux sous-groupes : *Aerogenes cloacae* et *Coli*, et il les divise eux-mêmes d'après leur faculté de fermenter la glycérine, le saccharose et la salicine, de liquéfier la gélatine, et d'après leur mobilité.

Voici le schéma de cette classification :



Après ce travail de LEVINE, MACKIE (36) apporte à son tour une contribution à la question et déduit de ses travaux que les réactions de fermentation de l'inosite et de production d'indol constituent des tests importants pour la classification des organismes coliformes. Constatant que certains de ces bacilles ne fermentent pas le lactose, il fait passer ce caractère au second plan.

Toujours dans le même esprit que les précédents auteurs, MACKIE recherche les concordances possibles entre les divers tests ; il trouve ainsi que la fermentation de l'inosite est en corrélation avec d'autres propriétés : immobilité, encapsulation, production de colonies larges, fermentation du lactose, de l'adonite, du saccharose, du raffinose et de la salicine. Les bactéries qui fermentent le lactose, fermentent aussi le maltose, le fructose, le galactose, la glycérine et la dextrine. Voici la classification telle qu'elle est conçue par MACKIE :

A) Organismes produisant du gaz, formant de l'indol, ne fermentant pas l'inosite et ne liquéfiant pas la gélatine. — Exemple : *Coli* « typique ».

B) Organismes produisant du gaz, ne formant pas d'indol, ne fermentant pas l'inosite et ne liquéfiant pas la gélatine.

C) Organismes produisant du gaz, fermentant l'inosite, ne liquéfiant pas la gélatine. — Exemple : *B. lactis aerogenes*.

D) Organismes ne produisant de gaz avec aucun sucre — non liquéfiant. — Exemple : *Coli aerogenes*.

KOSER (37) étudie la nutrition carbonée de ce groupe de bacilles et particulièrement la possibilité pour eux d'utiliser le carbone du radical citrique. Certaines souches (rouge de méthyle négatif et VOGES-PROSKAUER positif) sont capables de vivre sur un milieu renfermant cette seule souche de carbone, alors que d'autres (rouge de méthyle positif et VOGES-PROSKAUER négatif) ne peuvent le faire.

BERGEY (38) reprend comme caractère principal la fermentation du lactose, et il distingue parmi les bacilles agissant sur ce sucre des types VOGES-PROSKAUER négatifs qu'il classe dans le genre *Escherichia* et des types VOGES-PROSKAUER positifs pour lesquels il crée le genre *Aerobacter*.

Il subdivise le premier de ces genres en 22 espèces suivant qu'ils peuvent ou non fermenter le saccharose, la salicine, la dulcité, qu'ils liquéfient la gélatine, qu'ils réduisent les nitrates, qu'ils sont ou non mobiles, enfin qu'ils coagulent le lait. Le genre *Aerobacter* est scindé en 7 espèces suivant la motilité, la fermentation du saccharose et de la dulcité, la liquéfaction de la gélatine et la formation de gaz à 37°.

Voici d'ailleurs le schéma que nous empruntons au livre de BERGEY (39) :

SCHEMA DES GENRES *ESCHERICHIA* ET *AEROBACTER*
DE LA TRIBU DES « *BACTERICAE* »
(famille des *Bacteriacees*)

Fermentation du dextrose avec formation d'acide ou d'acide et de gaz.

- a) pas de formation d'acétylméthylcarbinol,
- b) pas de liquéfaction de la gélatine.

Genre Escherichia.

- aa) formation d'acétylméthylcarbinol,
 - b) liquéfaction ou pas de liquéfaction de la gélatine,
- Genre Aerobacter.*

Genre Escherichia.

Bâtonnets mobiles ou immobiles, se trouvant ordinairement dans les intestins d'animaux normaux. Attaquent de nombreux hydrates de carbone en formant de l'acide et fréquemment de l'acide et du gaz. Ne produisent pas d'acétylméthylcarbinol.

SCHEMA DES ESPECES DU GENRE ESCHERICHIA

(d'après BERGEY)

1. — *Pas d'acide ou de gaz en saccharose.*

A. Pas de liquéfaction de gélatine.

a) Mobile.

b) Acide et gaz avec la salicine.

c) Acide et gaz avec la dulcité.

1. *Escherichia coli.*

cc) Pas d'acide et de gaz avec la dulcité.

2. *Escherichia paragrauenthali.*

bb) Pas d'action sur la salicine.

c) Le lait devient acide et coagule.

d) Acide et gaz avec la dulcité.

3. *Escherichia formica.*

dd) Pas d'acide ni de gaz avec la dulcité.

4. *Escherichia gruenthali.*

cc) Le lait devient légèrement acide ; puis alcalin.

d) Réduction de nitrates.

5. *Escherichia vekanda.*

dd) Pas de réduction de nitrates.

6. *Escherichia pseudodysenteriae.*

aa) Non-mobile.

b) Acide avec la salicine.

7. *Escherichia anærogenes.*

bb) Acide et gaz avec la salicine.

8. *Escherichia enterica.*

bbb) Pas d'action sur salicine.

c) Réduction de nitrates.

9. *Escherichia vesiculiformans.*

cc) Pas de réduction de nitrates.

10. *Escherichia acidilactici.*

AA. Liquéfaction de gélatine.

a) Mobile.

b) Pas d'action sur salicine.

11. *Escherichia alba.*

2. — *Acide et gaz avec le saccharose.*

A. Pas de liquéfaction de gélatine.

a) Mobile.

b) Acide et gaz avec la salicine.

c) Acide et gaz avec la dulcité.

12. *Escherichia communior.*

cc) Pas d'acide ou de gaz avec la dulcité.

13. *Escherichia pseudocoloides.*

bb) Pas d'action sur salicine.

c) Le lait devient acide et coagule.

14. *Escherichia anindolica.*

cc) Le lait devient légèrement acide puis alcalin.

15. *Escherichia alcalescens.*

aa) Non-mobile.

b) Acide et gaz avec la salicine.

16. *Escherichia neapolitana.*

bb) Pas d'action sur la salicine.

c) Le lait devient acide et coagule.

17. *Escherichia pseudocoscroba.*

cc) Le lait devient légèrement acide puis alcalin.

18. *Escherichia galactophilæ.*

AA. Liquéfaction de gélatine.

a) Mobile.

b) Acide et gaz avec la salicine.

19. *Escherichia leporis.*

bb) Pas d'action sur la salicine.

c) Le lait devient acide et coagule.

20. *Escherichia gastrica.*

cc) Le lait devient acide puis alcalin.

21. *Escherichia plebeia.*

aa) Non-mobile.

b) Pas d'action sur la salicine.

22. *Escherichia ellingeri.*

Cette classification a été discutée par MALCOLM (40) qui a fait les remarques suivantes :

1°) Le groupe des bactéries coliformes renferme des types dont les caractères présentent une gradation continue ; il semble, dans ces conditions, anormal de le diviser en deux genres ;

2°) Les réactions de l'indol et de l'inosite n'ont pas été utilisées par BERGEY dans sa classification ; or, il s'agit là de caractères différentiels importants ainsi qu'il résulte des recherches de MACKIE (36), de MALCOLM (245) et de HAY (246).

MALCOLM estime de plus que la liquéfaction de la gélatine, préconisée par BERGEY, est un caractère peu précis pour ce groupe de bacilles. La protéolyse de la gélatine est en effet très lente, et une cause d'erreur possible réside dans l'action d'endoprotéases libérées de cellules mortes. Chez les types non mobiles, VOGES-PROSKAUER positifs, la production d'indol est en corrélation étroite avec la liquéfaction de la gélatine et est beaucoup plus facile à apprécier que cette dernière.

La fermentation de la salicine serait, elle aussi, une mauvaise réaction ; le même auteur a constaté que certaines souches typiques de *B. coli* communis et de *B. coli* communior ne fermentent pas la salicine. MALCOLM a étudié 1.636 cultures de bactéries coliformes ; il a effectué sur chacune d'elles les réactions biologiques connues et il est arrivé à les classer en 8 sous-groupes : *B. coli* typique, 3 types intermédiaires, *B. Friedländeri*, *B. cloacae*, *B. oxytocus*, *B. aerogenes*, en utilisant les réactions de VOGES-PROSKAUER, KOSER, de fermentation d'inosite et la production d'indol.

CLASSIFICATION DE MALCOLM

	VOGES- PROSKAUER	KOSER	INOSITE	INDOL	NOMBRE de souches
1) <i>B. coli</i>	—	—	—	+	882
2) Intermédiaire.	—	+	—	+	18
3) Intermédiaire.	—	+	—	—	126
4) Intermédiaire.	—	+	+	+	23
5) <i>B. Friedländeri</i>	—	+	+	—	33
6) <i>B. Cloacae</i>	+	+	—	—	211
7) <i>B. Oxytocus</i> ..	+	+	+	+	71
8) <i>B. Aerogenes</i> ..	+	+	+	—	233

Il a ensuite effectué sur chacun de ces groupes des réactions fermentatives sur les sucres suivants : adonite, saccharose, dulcité, inuline, ainsi que l'examen de la liquéfaction de la gélatine et de la mobilité. Ces divers tests lui ont permis de comparer ses souches à celles de MAC CONKEY (21) et (22).

Nous lui avons emprunté le tableau ci-dessus qui montre le degré de fréquence de chacune de ces réactions et qui donne le pourcentage des bacilles examinés appartenant à chaque sous-groupe :

**Degré de fréquence des réactions
appliquées par MALCOLM aux bacilles du groupe coli.**

	MOBILITÉ		ADONITE		SACCHAROSE		DULCITE		INULINE		GÉLATINE		TOTAL
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
Sous-groupe I Coli	785	97	406	776	512	370	692	190	0	882	5	877	882
Sous-groupe II Intermédiaire	13	5	7	11	12	6	12	6	0	18	1	17	18
Sous-groupe III Intermédiaire	124	2	1	125	48	78	40	86	0	126	9	117	126
Sous-groupe IV Intermédiaire	1	22	23	0	23	0	7	16	1	22	0	23	23
Sous-groupe V B. Friedländeri	4	29	33	0	33	0	14	19	5	28	3	30	33
Sous-groupe VI B. Cloacae	198	13	4	207	211	0	59	152	13	198	141	70	211
Sous-groupe VII B. Oxyfucus	4	67	70	1	71	0	55	16	59	12	47	24	71
Sous-groupe VIII B. Aerogenes	34	199	122	11	232	1	42	191	43	190	24	209	233

On peut imaginer que pour chaque sous-groupe la positivité ou la négativité de chacun des caractères envisagés ci-dessus conduit à un nombre de variétés extrêmement grand.

III. — *Conclusion.*

Tous ces travaux permettent-ils de dégager une classification nette, rigoureuse des microbes du groupe Coli ? Nous ne le croyons pas et nous pensons qu'en dehors de quelques sous-groupes assez bien marqués, il sera difficile de définir des types microbiens à caractère précis groupant toutes les souches possibles.

Comme nous le disions au cours de ce chapitre, toutes ces souches présentent entre elles une gradation insensible de caractères qui fait que certains types diffèrent entre eux par très peu de chose.

Ces microbes possèdent une « mosaïque » de caractères dont les combinaisons théoriquement possibles sont indéfinies. Si l'on ajoute à cela les degrés de l'intensité des réactions qu'ils présentent, on voit qu'il faudrait arriver à faire sur chaque souche un nombre très grand, peut-être infini, de réactions pour une classification en types rigoureusement semblables.

MALCOLM qui, dans son travail, a tenu compte de tous les essais faits antérieurement, souligne lui-même la fragilité de certains sous-groupes qu'il propose. Il fait remarquer par exemple que le sous-groupe II de sa classification ne diffère du sous-groupe I que par la positivité de la réaction de KOSER ; or, d'une part, RUCHHOFF (44) a remarqué que même les colis typiques poussent, très légèrement certes, mais poussent tout de même, dans le milieu au citrate ; il n'y a donc entre ces deux catégories qu'une différence d'intensité de la réaction de KOSER. D'autre part, un grand nombre de cultures de ce sous-groupe II perdent le caractère KOSER + par culture sur milieu artificiel. Ce fait de la variation des caractères au cours des repiquages, bien connu des bactériologues, n'est pas fait pour simplifier la question.

B. — CARACTÈRE ET CLASSIFICATION DE NOS SOUCHES

Nous venons de voir qu'à défaut d'une classification parfaite, il a fallu se contenter de diviser les microbes voisins du Coli en vastes sous-groupes d'après quelques réactions importantes résumant à elles seules le plus possible de caractères.

Nous avons effectué ces réactions sur nos souches en nous basant sur le travail de MALCOLM dont nous avons retenu les critiques faites à l'égard de la classification de BERGEY. Rappelons que les réactions indiquées par ce premier auteur sont :

VOGES-PROSKAUER, KOSER, Inosite, Indol.

Nous avons complété par l'épreuve de mobilité.

Les souches soumises à ces réactions présentaient par ailleurs les caractères généraux décrits au début de ce chapitre et particulièrement des réactions de fermentation à l'égard du glucose et du lactose.

Avant tout, nous allons donner quelques précisions sur ces réactions et indiquer de quelle façon elles ont été effectuées.

a) *Fermentation du lactose.* — Chacune des souches a été ensemencée sur gélose lactosée tournesolée, préparée en ajoutant aseptiquement à des tubes contenant 9 c.c.² de gélose ordinaire fondue, douze gouttes de solution de lactose stérile à 30 % et la même quantité de teinture de tournesol également stérile. Après mélange on place en position inclinée et on laisse refroidir. On laisse quelques jours à l'étuve pour assécher la surface de la gélose et on ensemence légèrement de façon à obtenir des colonies isolées. On apprécie le virage au tournesol de la façon suivante :

+++ gélose rouge en 12 heures.
++ gélose rouge en 48 heures.
+ gélose rouge en 72 heures.
O rien après 72 heures.

b) *Fermentation du glucose avec production de gaz.* — On prépare des tubes de bouillon ordinaire glucosé à 2 % dans chacun desquels on introduit un petit tube cylindrique fermé à une extrémité et ouvert à l'autre (cette extrémité ouverte étant placée vers le bas). Ces petits tubes mesurent 7 m.m. de diamètre et 35 m.m. de haut ; ils flottent à la surface du bouillon lorsqu'on vient de les introduire, mais au cours de la stérilisation, l'air qu'ils contiennent s'échappe et leur poids les fait plonger entièrement.

Les tubes ainsi préparés sont ensemencés séparément avec chacune des souches à essayer. On laisse incuber à l'étuve et on observe, lorsque la réaction est positive, que les gaz résultant de la fermentation se sont accumulés dans le petit tube et l'ont soulevé d'une hauteur variable. On apprécie la hauteur occupée par

le gaz dans le tube en fonction de la hauteur totale du petit tube qui donne une idée de l'intensité de la fermentation :

- +++ entre 1/2 et 3/4 du tube soulevé.
- ++ entre 1/4 et 1/2 du tube soulevé.
- + entre 0 et 1/4 du tube soulevé.
- 0 rien.

RÉACTION DE VOGES-PROSKAUER

Certaines souches sont capables de se développer dans des milieux glucosés en produisant de l'acétylméthylcarbinol $\text{CH}_3 \cdot \underset{\text{OH}}{\text{CH}} - \text{COCH}_3$. HARDEN et NORIS (45) montrèrent en 1911 que

par addition d'un alcali, l'acétylméthylcarbinol est oxydé en diacétyle qui, en présence de la peptone contenue dans le bouillon de culture, donne une réaction colorée.

La production d'acétylméthylcarbinol semble résulter de la condensation de 2 molécules d'acétaldéhyde sous l'action d'une diastase



La réaction serait favorisée par l'introduction d'accepteurs d'hydrogène dans le milieu.

Quels sont les procédés de recherche de l'acétylméthylcarbinol produit dans les cultures ?

DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et CHU (46) ont en 1931 étudié les techniques proposées antérieurement et sont arrivés au mode opératoire suivant : Ils cultivent la souche microbienne dans le milieu ci-après :

Peptone de Witte	5 gr
Glucose	5 gr
Phosphate dipotassique	5 gr
Eau dist. qsp.....	1.000
pH 7,5	

Au bout de 24 heures — 3 et 5 jours, on oxyde par agitation à l'air ou par l'eau oxygénée après avoir alcalinisé par de la soude ou de la potasse.

O'MEARA (47) a publié en 1931 une technique simple qui présente l'avantage de s'effectuer en milieu synthétique et d'éviter ainsi toute cause d'erreurs dues à des colorations produites par des réactions de produits secondaires autres que le diacétyle sur la peptone. C'est cette technique que nous avons adoptée.

Voici la composition du milieu de O'MEARA :

Chlorure de sodium	5 gr
Phosphate bipotassique	1 gr
Phosphate biammonique	1 gr
Sulfate de magnésium	0 gr 2
Fumarate de soude.....	10 gr (ou acide fumari- que 7 gr)
Glucose	5 gr
Citrate de soude	2 gr 77
Eau qsp.....	1.000

On amène à pH 7,5 par addition de soude. On répartit à raison de 5 c.c.³ par tube à essai et on stérilise à 110° pendant 20'. Le fumarate de soude est vraisemblablement l'accepteur d'hydrogène et favorise la formation de l'acétylméthylcarbinol. Le citrate de soude sert à tamponner le milieu.

Les souches microbiennes ensemencées dans ce milieu poussent très bien à 37°. Après 24 heures, on ajoute dans chaque tube 0 gr. 05 de créatine et 2 gouttes de lessive de soude. On agite vivement pendant 5 minutes et on note

Coloration rose vif.....	++
Coloration rose	+
Pas de coloration	0

RÉACTION DE KOSER

La réaction de KOSER est basée sur le fait que certaines souches de bactéries voisines du Coli sont capables d'utiliser l'ion citrique comme seule source de carbone. Le milieu préconisé par KOSER est le suivant :

Chlorure de sodium	5 gr
Sulfate de magnésium	0 gr 2
Phosphate potassique	1 gr
Phosphate diammonique	1 gr
Citrate de soude	2 gr 77
Eau qsp.....	1.000

On amène à pH 7,5, on filtre, on répartit en tubes à essai (7 c.c.³ 5 par tube) et on stérilise à 110° pendant 20'.

Toutes nos cultures ont été ensemencées séparément dans ce milieu et placées à l'étuve à 37° pendant 10 jours avec observation. La plupart des germes capables de se développer dans ce milieu donnent un trouble bien net après 24 heures d'étuve. Pourtant il n'est pas inutile de prolonger l'incubation, car certains ne donnent leur optimum que vers le septième ou le huitième jour.

Nos résultats, consignés dans le Tableau de la page 54, s'interprètent de la façon suivante :

+++	pousse abondante	au bout de 8 jours.	
++	pousse moyenne		—
+	léger trouble		—
O	pousse nulle ou infime		—

FERMENTATION DE L'INOSITE

Nous avons préparé de l'eau peptonée à laquelle nous avons ajouté aseptiquement une solution d'inosite stérilisée de façon à avoir une concentration de 0,5 %. Nous avons ajouté aussi quelques gouttes de teinture de tournesol stérile. Nos souchesensemencées dans ce milieu ont été laissées 2 semaines à l'étuve :

+	indique virage de Tournesol.
O	indique aucun virage.

RÉACTION DE L'INDOL

Nous l'avons effectuée sur nos souches d'après le procédé classique : Une culture en eau peptonée (8 c.c.³) ayant incubé 4 jours à 37° est additionnée de 10 gouttes d'une solution de nitrite de soude à 1 % puis de 10 gouttes d'acide sulfurique concentrée. S'il y a de l'indol il se produit une coloration rose rouge que l'on rassemble avec de l'alcool amylique. On apprécie l'intensité de la coloration et l'on désigne par

O	aucune coloration.
+	teinte rose très légère.
++	teinte rose notable.
+++	teinte intense.

L'origine de la peptone est très importante pour la réussite de cette réaction. Ayant eu des résultats contradictoires avec des peptones de diverses origines, nous avons fait de nouvelles expériences en utilisant deux échantillons différents de la peptone WITTE, deux échantillons également différents de peptone CHAPOTEAUT et un échantillon de peptone BYLA. Voici les résultats obtenus :

Souche	Chapoteaut 1	Chapoteaut 2	Witte 1	Witte 2	Byla
Laffly	+	+	+	O	O
W.....	+	+	+	O	O
Th.....	+	+	+	O	O
Phéné.....	+	+	+	O	O
X.....	++	++	+++	+++	+++

On constate que les deux échantillons de peptone CHAPOTEAUT donnent des résultats identiques ; par contre, les deux peptones de WITTE se comportent un peu différemment l'une de l'autre. La peptone BYLA nous a donné des réactions moins sensibles sauf pour la souche X.

La peptone de WITTE I nous paraît la plus convenable et nous l'adoptons pour nos essais.

ÉPREUVE DE MOBILITÉ

L'épreuve de mobilité a été effectuée en examinant au microscope en goutte pendant une culture en bouillon ordinaire ayant subi une incubation de 16 heures à la température du laboratoire. Une précaution doit être prise si l'on veut éviter des erreurs : il faut éviter de mettre au point sur le plan situé au voisinage immédiat de la lamelle. Dans cette zone en effet les microbes subissent une attraction de la part de la paroi et se montrent généralement immobiles alors que dans les parties plus profondes de la goutte, la mobilité est visible. On a la preuve de l'attraction de la paroi par le fait que certains bacilles, au cours de leur déplacement, heurtent la lamelle et s'y accrochent à une de leurs extrémités. On les voit alors agiter l'extrémité libre. D'autres sont fixés longitudinalement sur la lamelle. La mise au point étant faite convenablement, on constate que dans certaines cultures, l'intensité et la nature du déplacement varient d'une cellule à l'autre.

Alors que certains microbes paraissent immobiles, d'autres se déplacent lentement et certains rapidement. Chez les uns, le déplacement se fait par un mouvement de culbute plus ou moins rapide ; chez d'autres, par mouvement alternativement à droite et à gauche ou en haut et en bas de l'une ou des deux extrémités. Il est probable que ces inégalités dans le mouvement proviennent de l'action plus ou moins efficace et équilibrée des cils vibratiles péritriches.

Les cils semblent provoquer parfois un enchevêtrement de bacilles qui deviennent dès lors obligatoirement immobiles. Dans ce cas, afin d'éviter des erreurs, il convient d'examiner de préférence des microbes isolés.

- O signifie immobile.
- + faible mobilité.
- ++ mobilité plus accentuée.
- +++ très mobiles.

C. — CONCLUSION

Les résultats de toutes ces épreuves auxquelles nous avons soumis nos souches (tableau II ci-après) montrent qu'en dehors de l'une d'elles, la souche « Jean », toutes les autres appartiennent au groupe Coli suivant MALCOLM (genre *Escherichia* de BERGEY).

Certaines d'entr'elles : PORT, LAFFLY, X et Val III appartiennent au sous-groupe III intermédiaire (MALCOLM).

TABLEAU II

NOM de la Souche	FERMENTATION de Lactose	FERMENTATION de Glucose (gaz)	RÉACTION de Voges	RÉACTION de Koser	FERMENTATION de l'Inosite	RÉACTION de l'Indol	MOBILITÉ	CLASSIFICATION d'après Malcolm	GENRE d'après Berger
Th	+++	++	0	0	0	++	0	Coli	Escherichia
Port	+++	++	0	++	0	0	+++	S/Groupe III intermédiaire	id.
4	+++	++	0	0	0	+	++	Coli	id.
10	+++	++	0	0	0	++	+	Coli	id.
Loire II	+++	++	0	0	0	+	0	Coli	id.
Laffly	+++	+++	0	+	0	0	+++	S/Groupe III intermédiaire	id.
X	+++	++	0	+	0	++	0	S/Groupe III intermédiaire	id.
Phéné ...	+++	++	0	0	0	0	++	Coli	id.
Jean	++	+++	+	++	++	traces	0	Aérogènes	Acrobacter
1	+	++	0	0	0	+	++	Coli	Escherichia
Val I	+	++	0	0	0	++	0	Coli	id.
Urinaire ...	+	+++	0	0	0	+++	0	Coli	id.
Val II	++	++	0	0	0	+	+	Coli	id.
Val III	+	+	0	+	0	++	0	S/Groupe III intermédiaire	id.
1108	+	+	0	0	0	++	+	Coli	id.
1109	+	+	0	0	0	++	++	Coli	id.

CHAPITRE II

EXTRACTION DES BACTÉRIOPHAGES ANTICOLI DES MILIEUX NATURELS

A. — SOURCES CONNUES DE BACTÉRIOPHAGES ANTI-COLI

I. — *Déjections.*

Les bactériophages actifs contre les germes du groupe Coli et plus généralement du groupe Coli, typhi, dysentérique, se trouvent de façon très fréquente dans les selles de l'homme sain. Ils ont été mis en évidence par plusieurs expérimentateurs parmi lesquels nous citerons : d'HÉRELLE (48) et (49), HAUDUROY (50), LIPSKA (51), DEBRÉ et HAGENAU (52), DUMAS (53) et DA COSTA CRUZ (54).

Les déjections d'animaux en renferment habituellement ainsi que l'ont démontré WAGEMANS (55), MAKASHIHI (56), MARCUSE (57), RABINOWITZ (58), LEINOS MONTEIRO (59). LIPSKA (60) en a même trouvé dans l'intestin des animaux marins.

L'urine de l'homme et des animaux en contient, elle aussi, assez souvent, ainsi qu'il résulte des travaux de d'HÉRELLE (61), CALDWELL (62), LARKUM (63).

Les bactériophages ainsi obtenus sont généralement peu actifs ; on peut cependant augmenter leur puissance par passages. On obtient par contre, d'emblée, des principes lytiques plus actifs et parfois très actifs à partir de déjections de malades atteints d'une maladie infectieuse.

Nous avons vu que le premier agent lytique antidysentérique a été obtenu par d'HÉRELLE à partir de déjections de malades atteints de dysenterie bacillaire. Des recherches faites par la suite par le même auteur puis par HAUDUROY (64) chez des malades atteints de fièvre typhoïde, ont permis d'extraire de leurs selles des corpuscules lytiques très actifs sur le germe responsable.

Ces savants ont précisé comme suit l'apparition du bactériophage. On commence à le trouver lorsque la température du malade baisse et sa présence persiste jusqu'à la fin de la maladie. Le maximum de puissance du principe coïncide généralement avec le début de la défervescence.

On peut se demander quelle est l'origine de ces principes lytiques : Pour d'HÉRELLE (90), chaque être vivant muni d'un intestin, est envahi peu après sa naissance par une souche de colibacille qui s'y fixe. Ce savant admet en outre, qu'en raison du grand nombre de souches de coli porteuses de bactériophage, ce n'est pas un coli seul, mais une symbiose coli-bactériophage qui envahit l'intestin.

Il est raisonnable de penser que d'autres principes lytiques peuvent être aussi amenés dans le tube digestif par les eaux de boisson, l'air, etc... ; mais, d'HÉRELLE admet que ceux-ci sont éliminés et qu'il ne subsiste dans l'intestin que le bactériophage initial.

Si l'on accepte cette façon de voir, la présence de bactériophages dans les selles pourrait s'expliquer par une modification passagère de l'équilibre symbiotique sous l'influence de causes diverses. Une partie du principe pourrait aussi traverser l'intestin, se répandre dans la circulation et filtrer à travers le rein, ce qui expliquerait sa présence dans l'urine.

D'HÉRELLE pense que dans le cas de maladie infectieuse, ce bactériophage intestinal serait capable de s'adapter à la lyse du germe pathogène.

II. — *Eaux de rivière.*

Etant donné la présence de bactériophage dans les déjections, il n'est pas surprenant de le trouver dans les eaux de rivières et même dans l'eau de mer, au voisinage des côtes. [FEJGIN (114), BERGONZINI et LI-YEN-YOUNG (66), FORTUNATO (113)].

Les eaux de ruissellement ou d'infiltration qui constituent les cours d'eau, subissent de façon presque inévitable durant leur parcours, le contact avec des déjections animales ou humaines et se contaminent en germes microbiens et en bactériophages.

Les eaux d'égouts qui, ainsi que nous le verrons plus loin, sont riches en principes lytiques, viennent également se déverser dans les rivières. Elles ont bien subi un traitement biologique destiné à réduire leur contenu en microbes et à les clarifier ; mais ce traitement n'agit que partiellement sur les bactériophages qui passent en assez grand nombre dans l'eau épurée.

Parmi les investigateurs qui ont recherché et souvent trouvé des principes lytiques dans les eaux, citons : FRANCO (67), LIPSKA (60), CALDWELL (62), ARLOING (68) (69) (70), MONTEIRO (71), MANOLIN et COSTIN (72), FEJGIN (65), BUJANOWSKI (73), ELDER et TAUNER (74), MAZETTI (75), STEWART et GLOSAL (76), NYBERG (77),

GILDEMEISTER et WATANABE (78), VON VAGEDES (79), SCHLOSSMANN (80), VON VAGEDES et GILDEMEISTER (81), DIÉNERT, ETRILLARD et MME LAMBERT (82), SHURMAN (83) (84) (85), DE ASSUMPCAO et RODOVALLO (86), NICK (87), BRUSCO (88), MME PANAYOTATOU (89), RHODES et LUDLAM (115).

III. — *Eaux d'égouts.*

Une autre source de bactériophages qui est peut-être la plus importante de toutes, en raison de la diversité des principes que l'on y trouve, est constituée par les eaux d'égouts.

On sait que dans les grandes villes, ces eaux reçoivent la totalité des matières fécales et des urines qui, comme nous l'avons vu, constituent la source initiale des principes lytiques ; les déjections des malades à tous les degrés de la maladie s'y trouvent rassemblées et avec elles, des bactériophages à tous les degrés d'activité.

Nous verrons plus loin que certains de ceux-ci sont adsorbés par diverses matières minérales ou organiques en suspension dans ces eaux ; d'autres sont détruits par la présence de substances chimiques diverses qui sont parfois déversées à l'égout. Il en reste cependant d'ordinaire un assez grand nombre et on peut les extraire par une technique simple que nous exposerons ci-après.

Les auteurs suivants ont utilisé cette source pour la préparation de leurs principes lytiques : d'HÉRELLE (90), NAKASHI (91), COSTA (92), BUJANOWSKI (93), GOUGH (94), BULGAKOV et SERTIC (95), BECKWITH et ROSE (96), NYBERG (97), CALDWELL (116), NICK (117).

IV. — *Sources diverses.*

Nous venons d'énumérer ci-dessus, les trois sources principales de bactériophage anti-coli et nous avons dit que dans les trois cas son origine est la même : il provient des déjections humaines ou animales.

Le principe lytique anti-coli existe aussi dans divers autres produits ainsi que nous allons le voir maintenant ; mais ceux-ci, bien que pouvant être utilisés pour son extraction, ne constituent généralement pas des sources à proprement parler, exception faite, toutefois, pour les extraits pancréatiques.

Dans la plupart de ces cas, les déjections sont encore responsables de la présence du bactériophage ; c'est ainsi que la terre végétale en reçoit par le fumier [d'HÉRELLE (61)], que l'air en renferme parfois par les poussières provenant des matières fécales

desséchées ; on en a aussi trouvé, qui ont vraisemblablement la même origine, dans des extraits de mouche domestique [SHOPE (107)].

Les bactériophages qui existent de façon constante dans le tube intestinal des animaux, se retrouvent dans les préparations faites au moyen de cet organe. Ils ont ainsi été signalés dans des préparations d'entérokinase [PICO (108), KUTTNER (109), GJORUP (110), BORCHARDT (111)].

Ces principes lytiques du tube digestif peuvent aussi franchir la barrière intestinale et se répandre dans les tissus et les humeurs de l'organisme. On peut, en particulier, les mettre en évidence dans le sang [d'HÉRELLE (98), HAUDUROY (99)], dans le liquide céphalo-rachidien [MICHIO KASANARA (112)], dans le pus [d'HÉRELLE (100)] et dans le lait [LIPSKA (101)].

Pour finir cette énumération, nous mentionnerons que sa présence a été signalée à plusieurs reprises dans le pancréas et les extraits pancréatiques [HODER et SUZUKI (102), THOMAS (103), KLIENEBERGER (104)].

En raison de la richesse de cet organe en ferments, certains auteurs [BORCHARDT, GJORUP (*loc. cit.*)] ont pensé assimiler le bactériophage à une diastase. Mais, COMBIESCO (105) a réfuté cette façon de voir et montré que l'agent lytique présent dans les préparations de pancréatine, comme d'ailleurs dans celles d'entérokinase, constitue une impureté. FLU (106) a apporté un argument à cette même interprétation en constatant que du suc pancréatique de chat prélevé aseptiquement ne contient jamais de bactériophage.

★★

Ayant indiqué les sources de bactériophage anti-coli, nous allons maintenant exposer comment les expérimentateurs ont opéré pour l'extraire.

B. — TECHNIQUES CONNUES D'EXTRACTION DES BACTÉRIOPHAGES DES MILIEUX NATURELS

Le bactériophage, qu'il soit dans des déjections, dans de l'eau d'égout ou dans tout autre matériel, y existe le plus souvent mélangé à diverses impuretés minérales ou organiques grossières qu'il faut d'abord séparer.

Dans ce but, et lorsque le matériel est liquide, il suffit de lui faire subir une filtration sur papier en ajoutant un adjuvant tel

que la terre d'infusoires qui retient les microbes et les débris les plus gros. Si l'on utilise des déjections, on les émulsionne dans de l'eau et on traite le liquide obtenu de la même façon.

Cette opération préliminaire étant faite, trois moyens peuvent être employés pour séparer le bactériophage des impuretés solides qui l'accompagnent.

1°) L'ultrafiltration, qu'on peut réaliser facilement en utilisant les membranes préparées suivant la technique d'ASHESHOW (118).

Ces membranes laissent passer les bactériophages dont les dimensions sont de l'ordre de 20 à 30 μ et retiennent complètement les microbes.

2°) L'action de la chaleur qui détruit les microbes avant d'agir sur les bactériophages. Il suffit de soumettre le liquide à un chauffage ou mieux à une tyndallisation à 58° [BORDET et CINCA (119), TOMASELLI (120)]. Signalons que cette dernière technique ne peut convenir que lorsqu'on cherche à isoler des principes lytiques qui sont déjà très actifs.

HAUDUROY (121), WEINBERG et AZNAR (122) ont en effet montré que plus une souche de bactériophage est active, plus elle est résistante à la chaleur. Certaines souches faibles sont très sensibles et sont inactivées au voisinage de 60°.

3°) La filtration sur bougie de porcelaine est le moyen qui a été le plus habituellement employé.

Le dispositif de filtration généralement utilisé est celui du Docteur MARTIN; rappelons qu'il consiste en une bougie Chamberland L3 maintenue serrée dans un tube de verre au moyen d'un bourrelet de coton qu'on a préalablement placé autour de sa partie vernissée.

Ce dispositif est stérilisé au four à flamber. Pour effectuer la filtration, on relie l'extrémité ouverte de la bougie à l'extrémité d'un entonnoir traversant un gros bouchon en caoutchouc. On dispose par ailleurs d'une éprouvette tubulée, sur laquelle vient s'engager ce bouchon de caoutchouc. De cette façon la bougie et son tube sont à l'intérieur de l'éprouvette tandis que la partie évasée de l'entonnoir se trouve à l'extérieur.

Avant de faire le vide par la tubulure latérale de l'éprouvette, il importe de verser dans l'entonnoir le liquide à filtrer; si on négligeait cette précaution, l'air contenu dans la bougie s'opposerait au passage du liquide et augmenterait considérablement la durée de l'opération.

La filtration pure et simple est suffisante lorsque le bactériophage se trouve en quantité appréciable dans le liquide à partir duquel on veut l'extraire. Il n'en est pas toujours ainsi et il est

parfois préférable de procéder à un enrichissement préalable. De plus, il ne faut pas oublier que la filtration sur bougie de porcelaine retient toujours une fraction des bactériophages qui peuvent disparaître s'ils se trouvent en trop petit nombre. Ce fait peut lui aussi justifier un enrichissement.

Voici comment opèrent SERTIC et BULGAKOV (123). Ces auteurs préparent une solution concentrée d'extrait de levure (15 gr. pour cent) qu'ils ajoutent à 900 c.c. d'eau d'égout. Ils ajustent à pH 7,7-8 et ensemencent avec 10 c.c.³ d'une culture jeune en bouillon, de la bactérie vis-à-vis de laquelle ils désirent obtenir un bactériophage actif. Après 24 à 36 heures, ils filtrent et se servent du filtrat pour produire la lyse d'une émulsion de bacilles. Généralement ils ont d'emblée la dissolution totale des germes suivie d'une culture secondaire. Ils se servent de cette culture secondaire pour ensemencer un nouveau mélange eau d'égout-extrait de levure. Cette seconde expérience leur permet d'extraire de l'eau d'égout, s'il y en a, des bactériophages actifs contre la culture secondaire de la première opération. Après incubation et filtration, ils obtiennent une suspension de bactériophages très actifs.

Le choix de la souche microbienne qui sert à l'isolement d'un bactériophage a une grosse importance, particulièrement dans le cas du *B. coli*. Les souches de ce microbe sont, nous l'avons vu, très différentes entr'elles par beaucoup de caractères et particulièrement par leur plus ou moins grande sensibilité à la lyse. Le bactériophage que l'on recherche peut donc passer inaperçu si l'on n'a pris soin de lui fournir une souche vis-à-vis de laquelle il est actif.

Voici un exemple qui montre l'importance du choix de la souche microbienne :

D'HÉRELLE (124) (125), au cours de ses premières recherches sur le bactériophage contenu dans l'intestin de l'homme sain a d'abord trouvé que les filtrats de déjections ne contenaient pas toujours du principe lytique. Par la suite, il s'est aperçu que ce résultat était dû à l'insensibilité des souches employées vis-à-vis du filtrat. Il a procédé à des isolements de colonies de *coli* contenues dans les matières fécales qui lui servaient à préparer les filtrats et il a vu qu'un certain pourcentage seulement des cultures faites à partir de ces colonies était sensible aux filtrats. Ce pourcentage variable avec les échantillons des matières fécales étudiées était de 0 à 38 %.

Il faut donc, pour l'isolement d'un bactériophage, soit utiliser une souche que l'expérience a montrée particulièrement sensible, soit faire agir le même filtrat sur plusieurs souches.

C. — TRAVAUX PERSONNELS

I. — *Extraction de nos bactériophages.*

Les expériences que nous avons faites ont eu pour but de rechercher les moyens pratiques d'obtention des bactériophages anticoli. Comme source, nous nous sommes adressés aux matières suivantes :

1°) déjections de poules ; 2°) déjections de cheval ; 3°) boues de décantation d'eaux d'égout ; 4°) dépôts d'alumine provenant de la clarification des eaux de rivière avant épuration.

Enfin, nous avons recherché la présence des bactériophages dans diverses pancréatines commerciales.

Nous avons vu qu'on peut souvent obtenir des liquides actifs par simple filtration sur bougie du matériel naturel contenant du principe lytique, préalablement filtré sur papier en présence de terre d'infusoires.

La plupart des expérimentateurs cherchant à isoler des bactériophages se sont contentés d'opérer ainsi. Cette façon de procéder est généralement suffisante car le principe lytique anticoli existe le plus souvent en quantités importantes dans le matériel d'extraction. Toutefois, dans certains cas, il peut passer inaperçu par cette technique, à cause de son adsorption par les impuretés de toute sorte au contact desquelles il se trouve dans les milieux naturels.

De nombreux travaux ont en effet montré que le bactériophage, micelle colloïdale, est facilement adsorbé par différentes matières. C'est ainsi que GILDEMEISTER et HERZBERG (126), puis SEIFFERT (127) ont constaté qu'en milieu acide (pH 6) le kaolin et la terre d'infusoires fixent le bactériophage. MURAINATURA (128) a fait la même constatation avec l'hydroxyde d'aluminium. D'autres observations ont porté sur le noir animal [BORTER et MAISIN (129)], divers colloïdes métalliques [DECKER (130)], des protéines telles que la globuline sérique [MAC KINLEY et DOUGLAS (131)], etc...

Ajoutons d'après les travaux de JAUMAIN et Mlle MEULEMANS (132) et de DA COSTA CRUZ (133) que les microbes morts adsorbent eux aussi les bactériophages, mais que l'adsorption est ici spécifique.

Nous avons tenu compte de ce phénomène d'adsorption et dans tous les cas nous avons traité le matériel qui nous a servi de source de bactériophage par une solution légèrement alcaline afin de provoquer l'élution des principes adsorbés. Nous avons choisi à cet effet le mélange de phosphates di- et monosodique

avec lequel on peut faire aisément un tampon à pH 8,4, contenant 2 % de ces sels. Après extraction des bactériophages et filtration sur bougie, on ramène le pH de cette solution à 7,8 par une solution de phosphate monosodique, afin de se trouver dans des conditions favorables à la bactériophagie.

a) *Bactériophages à partir des déjections.* — Le traitement des déjections de chevaux et de poules a été identique. Voici comment nous avons opéré : 2 gr. environ de déjections sont mises dans un tube à essai avec 20 c.c. de solution tampon phosphatée. On agite vigoureusement pendant quelques minutes et on filtre. Le filtrat est généralement trouble surtout avec les déjections de poule. Pour l'éclaircir, on ajoute une pincée de terre d'infusoires lavée (1), on agite et filtre sur papier. Le liquide est ensuite filtré sur bougie Chamberland L3 et amené à pH 7,8, au rouge de phénol, au moyen de quelques gouttes de solution stérile de phosphate monosodique ajoutée aseptiquement.

Nous avons préparé ainsi trois filtrats au moyen de déjections de poules, d'origines différentes, et trois autres, au moyen de déjections de cheval.

Les liquides obtenus ont été ajoutés respectivement à des émulsions faibles en bouillon de chacune de nos souches (tubes B); on a préparé également des témoins (tubes T) contenant seulement l'émulsion microbienne à la même concentration.

Après incubation de 16 heures à 20°, on a constaté qu'avec certaines souches, le tube B est complètement limpide alors que le tube T est trouble; pour d'autres, le tube B est seulement plus clair que le témoin; enfin, dans certains cas, les deux tubes présentent la même opacité.

Nous savons que les passages exaltent l'activité du bactériophage. Nous les avons effectués suivant la technique habituelle en filtrant le contenu de chacun des tubes B sur bougie Chamberland L3 et inoculant le filtrat à la dose de 3 gouttes, à un tube de 10 c.c.³ de bouillon contenant 5 gouttes de culture de 12 heures à 37° du microbe.

Les tableaux ci-après montrent que dans certains cas, l'activité du principe lytique s'est en effet exaltée; certains tubes B qui au premier contact étaient aussi troubles que les témoins, ont donné au bout de quelques passages, des filtrats capables de provoquer l'éclaircissement total des émulsions microbiennes auxquels ils étaient ajoutés.

(1) La terre d'infusoires adsorbe le bactériophage en milieu acide mais non en milieu alcalin.

TABLEAU III

Recherche de bactériophage dans 3 filtrats provenant de déjections de poules d'origine différente

0 = aucune lyse; + = très léger éclaircissement; ++ = éclaircissement net;
+++ = lyse presque complète; ++++ = limpidité absolue

NOM de la souche	NUMÉRO du filtrat bactériophagique	P A S S A G E S					
		1 ^{er}	2 ^{me}	3 ^{me}	4 ^{me}	5 ^{me}	6 ^{me}
Loire II.....	1	+++	+++	+++	++++	++++	++++
	2	0	+	+++	++++	++++	++++
	3	0	0	+	+	++	++
Urinaire.....	1	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	2	+++	++++	++++	++++	++++	++++
	3	+++	++++	++++	++++	++++	++++
1108.....	1	+++	++++	++++	++++	++++	++++
	2	++	++	+++	+++	+++	+++
	3	+	+	0	0	0	0
1.....	1	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	2	++	++++	++++	++++	++++	++++
	3	++	++	++	+	+	+
Laffly.....	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0
10.....	1	+	+	+	+	+	+
	2	++	++	+++	+++	+++	+++
	3	+	++	+	++	++	++
X.....	1	+	++	++	++	++	++
	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0
Phéné.....	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0
1109.....	1	++	+++	++++	++++	++++	++++
	2	++	+++	+++	+++	+++	+++
	3	+++	++++	++++	++++	++++	++++
Port.....	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0
Th.....	1	+	++	++	++	++	++
	2	0	0	+	+	+	+
	3	0	0	0	0	0	0
4.....	1	++	+++	+++	+++	+++	+++
	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	+	+	+	+	+
Val I.....	1	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	2	+	++	+++	+++	+++	+++
	3	0	0	0	0	0	0
Val II.....	1	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	2	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	3	++	++	+++	+++	+++	+++
Val III.....	1	+	++	+	+	+	+
	2	++	+++	+++	++++	++++	++++
	3	0	0	+	+	+	+

TABLEAU IV

**Recherche de bactériophages dans 3 filtrats provenant
de crottin de cheval d'origine différente**

O = aucune lyse ; + = très léger éclaircissement ; ++ = éclaircissement net ;
+++ = lyse presque complète ; ++++ = limpidité absolue

NOM de la souche	NUMÉRO du filtrat bactériophagique	P A S S A G E S					
		1 ^{er}	2 ^{me}	3 ^{me}	4 ^{me}	5 ^{me}	6 ^{me}
Loire II	4	O	++	++	++++	++	++
	5	++	++	++	++	++	++
	6	+	+	+	+	++	++
Urinaire.....	4	++	++++	++++	++++	++++	++++
	5	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	6	+	++++	++++	++++	++++	++++
1108.....	4	O	+++	+++	+++	+++	+++
	5	++	++++	++++	++++	++++	++++
	6	O	O	+	+	++	++
1.....	4	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	5	++	++++	++++	++++	++++	++++
	6	+	+++	+++	+++	+++	+++
Laffly,.,.	4	O	O	O	O	O	O
	5	O	O	O	O	O	O
	6	O	O	O	O	O	O
10.....,.,.,.	4	+	++	++	++	++	++
	5	O	O	O	O	O	O
	6	O	O	+	+	+	+
X	4	++	+++	+++	+++	+++	+++
	5	+	++	++	+++	+++	+++
	6	O	O	+	++	++	++
Phéné.....	4	O	O	O	O	O	O
	5	O	O	O	O	O	O
	6	O	O	O	O	O	O
1109.....,.,.	4	O	O	O	O	O	O
	5	+	+++	++++	++++	++++	++++
	6	O	+	++	++	++	++
Port.....	4	O	O	O	O	O	O
	5	O	O	O	O	O	O
	6	O	O	O	O	O	O
Th.....	4	O	+++	++	+++	+++	++
	5	++	+++	+++	++	++	++
	6	O	O	O	O	O	O
4.....	4	+++	++++	+++	++++	+++	+++
	5	+++	++++	++++	++++	++++	++++
	6	+	++	++	+++	++	++
Val I.....	4	+	++	+	+	+	+
	5	O	++	+++	++	++	++
	6	+	+++	++	++	++	++
Val II.....	4	++	++++	++++	++++	++++	++++
	5	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	6	+	++++	+++	+++	+++	+++
Val III.....	4	O	O	O	O	O	O
	5	+	++	+	++	++	++
	6	++	+++	++	+++	+++	+++

On peut encore noter sur les tableaux ci-après, que certaines souches se sont montrées complètement insensibles à l'action des filtrats lytiques et ceci malgré les passages.

Nous verrons plus loin que ces souches dites « résistantes » présentent ce caractère à différents degrés. Les unes ont été complètement indifférentes à l'action de tous les filtrats que nous avons préparés ; d'autres, au contraire, se sont montrées sensibles à l'action de certains d'entre eux.

Nous n'insisterons pas davantage sur ces faits qui sont d'ailleurs bien connus. Nous voulions pourtant les souligner au lecteur afin de lui permettre d'interpréter les résultats consignés ci-après.

b) *Bactériophages des boues de décantation d'eaux d'égouts.* — Les eaux d'égouts, à leur arrivée dans les usines de traitement ; sont d'abord envoyées dans de grands bassins où elles subissent une décantation qui les débarrasse d'une partie des particules qu'elles tiennent en suspension.

Le dépôt qui s'accumule au fond des bassins constitue une boue noire ⁽¹⁾ que nous avons utilisée comme source de bactériophages anti-coli. Etant donné la diversité des constituants de ces boues, il était en effet permis de penser que certains d'entre eux devaient fixer des principes lytiques par adsorption et que ces derniers devaient pouvoir être libérés par élution en milieu alcalin.

Nous avons pu en effet constater que par un traitement identique à celui que nous avons pratiqué sur les déjections, il est possible d'extraire de ces boues un liquide riche en bactériophages anticoli.

On trouvera dans le tableau V ci-après les résultats obtenus.

c) *Bactériophages des boues d'alumine provenant de la clarification des eaux de rivières.* — Une autre source intéressante de bactériophages que nous avons trouvée, réside dans les boues provenant de la clarification des eaux de rivières.

On sait que ces eaux subissent généralement avant la stérilisation, un traitement destiné à les séparer de la plus grande partie des matières en suspension.

Voici comment on opère à l'usine d'Essones avant le traitement des eaux par l'ozone :

Les eaux brutes de Seine sont mélangées, au cours de leur passage dans le tuyau d'arrivée, avec une solution titrée de sulfate

(1) Les boues que nous avons utilisées pour ces expériences, proviennent des installations de Mesly et nous ont été aimablement procurées par M. Pouché que nous remercions bien vivement.

TABLEAU V

Recherche de bactériophages dans un filtrat provenant du traitement de boues de décantation des eaux d'égout

O = aucune lyse ; + = très léger éclaircissement ; ++ = éclaircissement net ;
+++ = lyse presque complète ; ++++ = limpidité absolue

NOM de la souche	PASSAGES					
	1 ^{er}	2 ^{me}	3 ^{me}	4 ^{me}	5 ^{me}	6 ^{me}
Loire II	+++	++++	++++	++++	++++	++++
Urinaire	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1108	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Laffly	O	O	O	O	O	O
10	++++	++++	++++	++++	++++	++++
X	+++	++++	++++	++++	++++	++++
Phéné	O	O	O	O	O	O
1109	++	++++	++++	++++	++++	++++
Port	O	O	O	O	O	O
Th	++	+++	+++	+++	+++	+++
4	O	O	O	O	O	O
Val I	++	++++	++++	++++	++++	++++
Val II	++	++++	++++	++++	++++	++++
Val III	++	+++	++++	++++	++++	++++

d'alumine. De là elles se rendent dans des grands bassins dont le fond est garni de sable. Le sulfate d'alumine subit une hydrolyse qui libère de l'alumine hydratée tandis que le pH de l'eau tend vers une très légère acidité. Cette alumine adsorbe certaines matières en suspension, les microbes et les bactériophages contenus dans des milliers de litres d'eau. Les impuretés plus grosses sont collematées et l'ensemble se dépose peu à peu dans des bassins de décantation.

Nous avons pu nous procurer un peu de ces boues alumineuses ⁽¹⁾ et nous les avons traitées comme les boues de décan-

(1) Nous remercions M. Mouton, de la Société des Eaux et de l'Ozone, qui nous a aimablement procuré ces boues.

tation des eaux d'égouts et comme les déjections dans le but d'y rechercher et d'en extraire des bactériophages anticoli.

Nous avons fait agir le liquide d'extraction sur nos souches dans les mêmes conditions que précédemment. Les résultats se trouvent sous le tableau VI ci-après.

TABLEAU VI

**Recherche de Bactériophages
dans un filtrat provenant du traitement de boues alumineuses
ayant clarifié des eaux de rivière**

O = aucune lyse; + = très léger éclaircissement; ++ = éclaircissement net;
+++ = lyse presque complète; ++++ = limpidité absolue

NOM de la souche	PASSAGES					
	1 ^{er}	2 ^{me}	3 ^{me}	4 ^{me}	5 ^{me}	6 ^{me}
Loire II	++	++++	+++	+++	+++	+++
Urinaire	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1108	++++	++++	++++	++++	++++	++++
I	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Laffly	O	O	O	O	O	O
10	++++	++++	++++	++++	++++	++++
X	++	++	+	+	+	+
Phéné	O	O	O	O	O	O
1109	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Port	O	O	O	O	O	O
Th	+	++	++	++	++	++
4	O	O	O	O	O	O
Val I	+	+	++	++	++	++
Val II	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Val III	++++	++++	++	+	+	+

d) *Bactériophages anticoli des pancréatines commerciales.* — Nos expériences ont porté sur des échantillons de poudre de pancréatine des marques suivantes: U.C.L.A.F., Tixier, Byla. Un gramme de chacun de ces produits a été émulsionné dans 20 c.c.³ de bouillon ordinaire et, au mélange, nous avons ajouté quelques

gouttes de culture de 24 heures de l'une de nos souches de *B. coli*. La même expérience a été répétée pour chaque souche microbienne. Après incubation de 14 heures à 37°, nous avons centrifugé et filtré les liquides clairs sur bougie ⁽¹⁾.

Ces filtrats ont été ajoutés à la dose de 3 gouttes à des tubes de 10 c.c.³ de bouillon ordinaire ayant reçu préalablement 5 gouttes de culture microbienne en bouillon, de 24 heures à 37°.

Le tableau VII donne les résultats obtenus par comparaison avec les témoins n'ayant pas reçu de filtrat.

Isolement de races pures de bactériophages. — Il est nécessaire, lorsqu'on fait des études portant sur des microbes, d'opérer sur des souches pures. La même précaution doit être prise lorsqu'on travaille le bactériophage ; or, les filtrats lytiques obtenus au cours des expériences que nous venons de décrire peuvent, ainsi que nous allons le voir, contenir plusieurs races ⁽¹⁾ de principes lytiques. Les passages ont bien, en effet, opéré une sélection qui a abouti à une multiplication plus abondante des corpuscules les plus vigoureux et les plus rapides dans leur attaque ; mais il peut néanmoins se faire que des principes moins actifs qui se trouvaient dans le premier liquide d'extraction, n'aient pas été éliminés complètement. Deux ou plusieurs races douées d'une faculté d'attaque et d'un taux de multiplication peu différents, peuvent aussi se retrouver dans les filtrats après les 6 passages, aucune raison n'intervenant cette fois pour éliminer l'une ou l'autre.

Pour réaliser l'isolement de lignées pures, la méthode n'est pas différente de celle employée pour les microbes ; l'équivalent de la colonie microbienne est la plage qui représente, ainsi que l'a montré d'HÉRELLE, une véritable colonie de bactériophages.

Si l'on étale sur gélose une dilution convenable de l'un quelconque des filtrats obtenus après 6 passages, en même temps qu'une goutte de la culture microbienne sur laquelle il est actif, on observe après incubation de quelques heures à 37°, que la surface de la gélose sur laquelle s'est développée la culture microbienne, est parsemée de plages.

L'isolement d'une race pure de bactériophages se fait aisément en piquant l'une de ces plages au moyen d'un fil de platine droit

(1) L'élution au moyen de solutions phosphatées ne nous a pas paru nécessaire dans ce cas. Les expériences préliminaires ont en effet montré que le bactériophage n'est pas fixé par adsorption sur les particules de pancréatine.

(1) Le mot « race » a été utilisé par d'HÉRELLE pour désigner des bactériophages en lignée pure. Il correspond au mot « souche » employé pour les microbes.

TABLEAU VII

**Recherche de bactériophages anticoli
dans des pancréatines commerciales en poudre**

O = aucune lyse; + = très léger éclaircissement; ++ = éclaircissement net;
+++ = lyse presque complète; ++++ = limpidité absolue

NOM de la souche	PANCRÉATINE employée	P A S S A G E S					
		1 ^{er}	2 ^{me}	3 ^{me}	4 ^{me}	5 ^{me}	6 ^{me}
Loire II	Uclaf...	++	+++	++++	++++	++++	++++
	Byla...	O	++	++++	++++	++++	++++
	Tixier ..	++	+++	++++	+++	+++	+++
Urinaire	Uclaf...	+++	++++	++++	++++	++++	++++
	Byla...	O	+++	++++	++++	++++	++++
	Tixier ..	++	+++	++++	++++	++++	++++
4108.....	Uclaf...	O	+	++++	++++	++++	++++
	Byla...	O	O	+	++	+	+
	Tixier ..	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1.....	Uclaf...	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	Byla...	O	++	+++	+++	+++	+++
	Tixier ..	+++	++++	++++	++++	++++	++++
Laffly	Uclaf...	O	O	O	O	O	O
	Byla...	O	O	O	O	O	O
	Tixier ..	O	O	O	O	O	O
10	Uclaf...	+	++	++++	++++	++++	++++
	Byla...	+	++	+	++	++	++
	Tixier ..	+	+++	+++	+++	+++	+++
X	Uclaf...	+++	++++	++++	++++	++++	++++
	Byla...	++	+++	++++	+++	+++	+++
	Tixier ..	O	++	++++	+++	+++	+++
Phéné.....	Uclaf...	O	O	O	O	O	O
	Byla...	O	O	O	O	O	O
	Tixie...	O	O	O	O	O	O
1109.....	Uclaf...	O	++	+++	++	++	++
	Byla...	O	+++	++++	++++	++++	++++
	Tixier ..	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Port.....	Uclaf...	O	O	O	O	O	O
	Byla...	O	O	O	O	O	O
	Tixier ..	O	O	O	O	O	O
Th	Uclaf...	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	Byla...	+	+	++	+++	+++	+++
	Tixier ..	+++	+++	++++	++++	++++	++++
4.....	Uclaf...	O	O	O	O	O	O
	Byla...	O	O	O	O	O	O
	Tixier ..	O	O	O	O	O	O
Val I.....	Uclaf...	O	O	++	+++	+++	+++
	Byla...	O	+	+	+	++	++
	Tixier ..	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Val II.....	Uclaf...	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	Byla...	O	+	++++	++++	++++	++++
	Tixier ..	+++	++++	++++	++++	++++	++++
Val III.....	Uclaf...	+++	++++	++++	++++	++++	++++
	Byla...	O	++	++++	++++	++++	++++
	Tixier ..	+++	+	++++	++++	++++	++++

et en portant ensuite cette pointe dans un tube de bouillon que l'on ensemence ensuite avec quelques gouttes de la culture microbienne.

La très petite quantité de bactériophage ainsi transportée est suffisante pour provoquer la lyse des microbes ajoutés. De ce premier contact, on obtient un liquide actif constitué par une suspension pure de corpuscules lytiques.

Par ce moyen, on peut extraire d'un matériel donné les bactériophages les plus actifs vis-à-vis d'un microbe donné mais, ainsi que nous l'avons dit, on élimine généralement et à cause des passages, le plus grand nombre de principes lytiques appartenant à une race lente à se reproduire. Si l'on cherche à obtenir ces derniers, au lieu d'étaler sur gélose, en même temps qu'une goutte de culture microbienne de 24 heures, une dilution du filtrat provenant du sixième passage, c'est le liquide d'extraction du matériel utilisé que l'on emploie après filtration sur bougie et dilution si cela est nécessaire.

Les plages obtenues sont habituellement de petite taille; afin d'éviter qu'elles ne soient masquées par le développement de la culture, il faut réduire la durée d'incubation au minimum (3 heures à 37° suffisent généralement) et prélever le bactériophage par piqure ainsi que nous l'avons indiqué précédemment. Les principes lytiques ainsi obtenus sont généralement peu actifs dès leur premier contact avec le microbe et il est nécessaire de leur faire subir quelques passages.

II. — *Conclusion.*

La conclusion de ces expériences est que les cinq sources que nous avons étudiées sont capables de fournir régulièrement ⁽¹⁾ des bactériophages actifs sur la plupart de nos souches de bacilles du groupe Coli.

L'examen des tableaux montre que les échantillons traités sont de valeur inégale ⁽²⁾; les boues de décantation d'eaux d'égouts constituent la meilleure source puis, viennent dans l'ordre, la pancréatine, les boues alumineuses, et les déjections de cheval puis de poules.

Certains bactériophages sont dès l'isolement assez actifs pour provoquer d'emblée la lyse de quelques-unes de nos souches;

(1) Des essais faits sur un grand nombre d'échantillons de ces divers produits montrent que le bactériophage anticoli s'y trouve de façon constante, quoique à des degrés d'activité variables.

(2) Cette appréciation est basée sur le chiffre obtenu en faisant le total des + au sixième passage.

d'autres exigent un certain nombre de passages pour aboutir à ce résultat ; d'autres enfin n'exaltent pas leur activité malgré les passages.

Nos souches microbiennes sont, ainsi qu'il fallait s'y attendre, diversement sensibles à l'action des principes lytiques ; les unes sont très sensibles, d'autres le sont moins ; certaines sont complètement résistantes. Nous n'avons observé aucun rapport entre la sensibilité au bactériophage et les caractères qui ont servi à la classification de nos souches.

L'isolement de races pures de bactériophages peut être pratiqué par la méthode des plages, soit à partir du liquide d'extraction du matériel traité, soit à partir des filtrats obtenus après un certain nombre de passages destiné à augmenter l'activité des principes lytiques présents.

CHAPITRE III

TITRAGE DES BACTÉRIOPHAGES ANTICOLI

PREMIÈRE PARTIE

MÉTHODE DES DILUTIONS

PRINCIPE. — Cette méthode, comme les suivantes, est basée sur la nature corpusculaire du bactériophage et sur le fait qu'un seul de ces corpuscules, lorsqu'il est actif, est capable de déterminer la lyse d'une émulsion microbienne faible.

Elle consiste à faire des dilutions de 10 en 10 fois plus grandes de la suspension à étudier et à vérifier sur chacun des tubes si le phénomène de la bactériophagie se produit, après ensemencement avec une culture microbienne sensible. Le dernier tube dans lequel la lyse s'est produite, contient de 1 à 10 corpuscules. Connaissant la dilution de ce tube, il est facile de déterminer la concentration en bactériophage du liquide.

A. — TRAVAUX ANTÉRIEURS

I. — *Exposé des travaux.*

C'est APPELMANS (134) qui a le premier utilisé ce procédé pour l'étude de l'action de l'alcool et de l'acide phénique sur le bactériophage. Cet auteur ajoute 1 c.c.³ de la suspension à titrer à 9 c.c.³ de bouillon ; il obtient ainsi la dilution 10^{-1} . Il prélève 1 c.c.³ de cette dilution et l'ajoute à 9 c.c.³ de bouillon ; il obtient ainsi la dilution 10^{-2} , etc... Il répète cette opération jusqu'à 10^{-11} . Chacun de ces tubes ainsi qu'un témoin sans bactériophage est ensemencé avec quelques gouttes de culture ; après incubation il note le dernier tube limpide et en déduit comme nous venons de l'exposer le nombre des corpuscules présents dans la suspension initiale.

WERTHEMANN (136) reprend la même technique sans y apporter de nouveau qu'un système de notation sans grand intérêt.

BRONFENBRENNER et KORB (137) étudient eux aussi cette méthode ; ils opèrent comme APPELMANS mais augmentent la préci-

sion de la mesure en diluant 2 c.c.³ de l'avant-dernière dilution active dans 200 c.c.³ de bouillon qui est ensuite réparti dans 20 tubes stériles. Chacun de ces tubes est ensemencé avec une souche microbienne sensible et est mis à l'étuve. Au bout de 18 heures, on compte, parmi les 20 tubes, ceux qui sont limpides.

CLARK (138) cherche si la méthode est fidèle; il trouve que 60 % seulement de déterminations parallèles portant sur la même suspension donnent le même résultat.

BERGSTRAND (139) a étudié en détail cette méthode des dilutions et en vante les avantages. Pour lui, les résultats obtenus sont plus nets que par la méthode des plages au sujet de laquelle il apporte quelques critiques que nous verrons plus loin.

KRUEGER (140) souligne deux facteurs importants dont il faut tenir compte et qui sont, d'une part, la quantité de microbes que l'on ajoute aux dernières dilutions actives et, d'autre part, la présence de microbes morts dans les cultures servant à l'ensemencement.

II. — *Précision de la méthode.*

D'HÉRELLE dans son livre (61) a vivement critiqué la méthode des dilutions et a mis en relief le peu de précision qu'on en peut attendre. Supposons, dit-il, qu'il y ait 81.000 millions de corpuscules par centimètre cube de la dilution originelle. Ceci représente 8 corpuscules à la dilution 10^{-10} ; le tube 10^{-11} est limpide ou trouble suivant que le centimètre cube prélevé dans la dilution 10^{-10} renferme ou non un corpuscule. Dans le premier cas on dira qu'il y a dans le liquide primitif 10.000.000.000, dans le second cas 100.000.000.000 de corpuscules. L'erreur est de 90.000.000.000.

Noter que cette erreur est d'autant plus grande que la concentration en principe lytique est plus importante.

Comme on l'a vu précédemment, BRONFENBRENNER et KORB ont amélioré la précision de cette méthode en répartissant l'avant-dernière dilution dans 20 tubes de bouillon. Dans l'exemple de d'HÉRELLE, ils auraient trouvé 80.000.000.000 et l'erreur n'aurait été que de 1.000.000.000. Il faut cependant remarquer que le résultat trouvé aurait été le même pour 89.500.000.000 de corpuscules.

En dehors de ces considérations théoriques, n'y a-t-il pas d'autres facteurs qui peuvent intervenir pour fausser les résultats?

Nos expériences ont porté sur ce point. Nous nous sommes inspirés des remarques des auteurs déjà cités et en particulier de KRUEGER.

B. — TRAVAUX PERSONNELS

I. — Influence du milieu.

Le milieu de culture qui convient le mieux pour la numération des bactériophages par la méthode des dilutions est un milieu riche dans lequel le microbe se développe avec abondance. Le bouillon ordinaire alcalinisé à pH 7,8 répond à cette condition. Par contre, nous avons constaté que l'eau peptonée salée ne permet pas d'obtenir, en particulier dans les dernières dilutions, des résultats aussi nets que le bouillon. Cela tient sans doute au fait que la multiplication microbienne est moins active dans ce deuxième milieu. La bactériophagie se produisant d'autant mieux que la multiplication microbienne est plus intense doit, dans ces conditions, se trouver ralentie.

II. — Influence de la quantité de microbesensemencés.

La quantité de microbes avec laquelle onensemence les diverses dilutions a une très grosse importance sur la précision de la mesure, ainsi qu'on peut s'en rendre compte par l'expérience suivante :

On prépare plusieurs séries de tubes dans lesquelles on met 10 c.c.³ des dilutions de 10^{-1} à 10^{-10} en bouillon ordinaire (pH 7,8) de bactériophage (B. Th) (1) très actif pour le coli sensible « urinaire ».

Chaque série reçoit respectivement 1 goutte, 2 gouttes, 4, 6, 10, 20 de culture microbienne fraîche (moins de 12 heures), titrée à 1,5 milliards de germes par centimètre cube. Les tubes sont maintenus à 20°. Au bout de 8 heures on observe les résultats consignés dans le tableau ci-dessous :

Quantité de Microbes (émulsion à 1,5 milliards)	Témoin	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	B ₇	B ₈	B ₉	B ₁₀	B ₁₁
1 Goutte normale..	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+++
2 " " " ..	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+++
4 " " " ..	+++	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+++
6 " " " ..	+++	—	—	—	—	—	+	+	+	+	++	+++
10 " " " ..	+++	—	—	—	—	+	++	++	++	++	++	+++
20 " " " ..	+++	—	—	—	+	++	++	++	++	++	++	+++
B ₁ , B ₂ représentant les dilutions 10^{-1} , 10^{-2} +++ = trouble. ++ = trouble léger, + = très léger trouble, = limpide.												

(1) Dans la suite de ce travail, nous désignerons les bactériophages par la lettre B suivie d'une ou de deux initiales ; le tout entre parenthèses. Exemple (B. Th) ; (B. Pu), etc...

Cette expérience montre que les tubes renfermant les dernières dilutions actives de bactériophage, ne s'éclaircissent complètement que si le nombre de microbes inoculés est inférieur à 150.000.000 pour les 10 c.c.³ de milieu (1). Le nombre de tubes louchés ou troubles augmente si celui des germes inoculés est lui-même plus grand.

Ce phénomène s'explique aisément en admettant que dans ces dernières conditions, le nombre des bactériophages, très inférieur au départ à celui des microbes, ne peut à aucun moment atteindre une valeur suffisante pour qu'il y ait un corpuscule lytique par bacille.

III. — Influence de la température d'incubation.

Nous avons vu par l'expérience précédente que lorsque le nombre des microbes inoculés ne dépasse pas 150 millions de germes pour 10 c.c.³ de bouillon, les tubes contenant les dernières dilutions de bactériophage sont tous limpides. Cette dernière expérience a été effectuée à 20°. Si l'incubation est faite à 25°, 30° et 37°, on observe les résultats suivants :

Quantités de microbes coli urinaire inoculés : 150 millions dans 10 cc³
Incubation : 8 heures

Température	T	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	B ₇	B ₈	B ₉	B ₁₀	B ₁₁
25°	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++
30°	+++	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+++
37°	+++	—	—	—	—	—	—	+	++	++	++	+++

+++ = trouble, ++ = trouble léger, + = léger louche, — = limpide.

Comme on le voit, si l'on élève la température d'incubation au-dessus de 25°, les tubes renfermant les dernières dilutions actives de bactériophage ne subissent pas une lyse complète.

Ici comme dans l'expérience précédente, c'est le nombre respectif des bactéries et des bactériophages qui intervient ; les bactéries à la température de 37° se développent rapidement, les bactériophages aussi, mais en raison de leur nombre très

(1) Le nombre de 150 millions de germes pour 10 c.c.³ de milieu s'entend dans les conditions de nos expériences et avec la souche microbienne et le bactériophage utilisé. Il est vraisemblable que tout autre bactériophage agissant sur le même microbe ou sur un autre donnerait un chiffre un peu différent. Ce qu'il y a lieu de retenir, c'est l'ordre de grandeur de l'inoculation microbienne si l'on veut être dans de bonnes conditions pour le dénombrement des principes lytiques.

inférieur au départ, ces derniers ne peuvent à aucun moment atteindre un nombre suffisant pour attaquer tous les microbes.

Un autre phénomène vient encore handicaper le bactériophage, c'est la stimulation de la pousse microbienne qui se produit au début dans un tube contenant des bactéries en présence de principe lytique. Cette multiplication plus rapide des microbes semble due à une réaction de leur part contre leur ennemi, le bactériophage.

IV. — *Influence de la durée d'incubation.*

Les expériences précédentes nous ont permis de vérifier qu'en opérant à 20° et en ensemençant un tube de 10 c.c. de notre bactériophage très actif (B. Th) dilué, avec cent cinquante millions de bactéries (coli urinaire), il est possible d'observer la lyse jusqu'à la dixième dilution. Le phénomène s'observe aisément au bout de 6 heures en comparant les tubes B₁, B₂, B₁₀ au témoin. Si au lieu de faire la lecture après 6 heures, on la fait au bout de 12 heures, 18 heures, 24 heures, les résultats restent généralement les mêmes ; tous les tubes qui étaient limpides se maintiennent dans cet état. Cependant, si on prolonge l'incubation, il peut se faire que dans certains des tubes apparaisse une culture secondaire. L'observation des résultats devra donc être faite après une durée de 24 heures au maximum.

V. — *Influence de la virulence (1) du bactériophage.*

Nous avons opéré jusqu'ici avec le bactériophage (B. Th) qui est très actif et nous avons étudié dans quelles conditions il peut être titré par la méthode des dilutions.

Nous allons voir maintenant si cette technique est applicable au titrage des bactériophages peu virulents.

D'HÉRELLE (61) a montré qu'en présence de bactériophages faibles, les bactéries se développent et que le phénomène de lyse n'apparaît pas. La méthode des dilutions ayant justement pour test la lyse d'une suspension microbienne au cours de sa multiplication, il semble impossible de l'utiliser pour dénombrer des corpuscules faibles.

(1) La virulence d'un bactériophage est l'aptitude à détruire le microbe. On peut la comparer à la virulence d'un germe microbien vis-à-vis d'un organisme vivant. Elle est fonction de la vitesse de multiplication mais aussi de la sécrétion de substances toxiques (lysines, substances bactéricides). On ne peut lui attribuer une valeur absolue ; elle dépend du microbe et de sa faculté de réaction.

Pour vérifier ce fait nous avons fait l'expérience suivante :

a) *Atténuation de notre bactériophage par la chaleur.* — 5 c.c.³ de notre bactériophage anticoli (B.Th) sont introduits aseptiquement dans une ampoule de 5 c.c. Cette ampoule est alors chauffée au bain d'eau pendant 1/2 heure à 65°.

Après refroidissement, on fait des plages par la méthode de d'HÉRELLE en étalant à la surface de la gélose contenue dans une boîte de PÉTRI : 1 goutte de la sixième dilution du contenu de l'ampoule et une goutte de culture de 24 heures, en bouillon ordinaire, de coli sensible.

Après incubation à 37°, on observe 19 plages. Ces plages sont de dimensions inégales : 5 mesurent 0,5 mm. de diamètre, 4 atteignent 2 mm. et les autres sont d'une taille intermédiaire.

Des plages faites dans les mêmes conditions avec le même bactériophage, avant chauffage, mesuraient 3 mm. Or, comme l'a montré d'HÉRELLE (61), pour un même bactériophage, la dimension des plages obtenues avec un microbe donné, est fonction de sa virulence.

Au moyen d'un fil de platine, nous avons prélevé une trace du bactériophage constituant l'une des petites plages de 0,5 mm. de diamètre et nous l'avons cultivé dans les conditions habituelles aux dépens d'une culture diluée de B. Coli urinaire. Nous avons utilisé ce principe lytique atténué pour des essais de numération par la méthode des dilutions.

b) *Essai de numération de bactériophage atténué par la méthode des dilutions.* — Nous avons fait une série de dilutions en bouillon de 10 en 10 fois plus grandes du bactériophage atténué dont la réparation a été décrite ci-dessus. Chacun de ces tubes contenant 10 c.c.³ de liquide a étéensemencé ainsi qu'un témoin avec 150 millions de colibacilles « urinaire » et maintenu en incubation à la température de 20° pendant 8 heures.

On a observé les résultats suivants :

	T	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	B ₇	B ₈	B ₉	B ₁₀
8 heures ...	+++	—	—	—	—	++	+++	+++	+++	+++	+++

Si l'on abandonne ces tubes à 20° et qu'on fasse de nouveau leur examen après 14, 24 et 48 heures, on peut voir que les tubes B₁ puis B₂ primitivement clairs se sont troublés.

14 heures ...	+++	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
24 heures ...	+++	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Si maintenant nous prenons les tubes troubles B₇, B₈ ou B₉ par exemple et si nous séparons les microbes d'abord par une filtration sur papier en présence de terre d'infusoires lavée puis sur bougie CHAMBERLAND L₃, nous obtenons un filtrat dans lequel il est possible de mettre en évidence du bactériophage par la méthode des plages. Ce bactériophage qui aurait dû lyser les microbes qui étaient dans les tubes d'où on l'a extrait, ne s'est pas manifesté à cause de sa virulence trop faible.

La méthode des dilutions ne peut donc être applicable dans le cas de bactériophages atténués par la chaleur. Nous avons pu vérifier d'une façon identique qu'elle ne l'est pas davantage lorsque le bactériophage est atténué par son contact avec un antiseptique ou avec une culture résistante (1). L'atténuation chimique peut être réalisée facilement par contact de quelques heures du liquide bactériophage avec du chloroforme, — décantation et évaporation aseptique pendant quelques instants sous vide pour éliminer le chloroforme.

L'atténuation par une culture résistante se fait très bien en ensemençant 10 c.c.³ d'une culture de 500.000.000 de germes avec une très petite quantité de bactériophage prélevée au moyen d'un fil de platine droit et laissant incubé à 37° pendant 4 ou 5 jours. En raison du petit nombre de corpuscules lytiques introduits, par rapport au nombre de microbes, la lyse ne peut se manifester par un éclaircissement marqué. Les bactériophages se multiplient néanmoins, mais de leur côté, les microbes acquièrent peu à peu la résistance vis-à-vis de ces principes lytiques qui s'atténuent parallèlement. Par filtration, on obtient une suspension de principe faible donnant sur gélose des plages qui sont habituellement de très petite dimension ; preuve d'une atténuation de la virulence.

Si l'on cherche à titrer de telles suspensions atténuées chimiquement ou par contacts avec une culture microbienne résistante on obtient des résultats en tous points comparables à ceux que donnent les bactériophages atténués par la chaleur. Les tubes

(1) Les agents capables d'atténuer les bactériophages sont très nombreux ; on peut classer ceux qui ont été étudiés en agents physiques, chimiques, biologiques. Les premiers comprennent : les rayons ultraviolets, les rayons X, les rayons corpusculaires du radon, la chaleur, le vieillissement, la congélation et le réchauffage, les pressions élevées.

Les composés chimiques atténuant ou détruisant les principes lytiques sont : les acides et les bases ; les antiseptiques minéraux (halogènes et dérivés, cyanures, métaux et dérivés) ; les antiseptiques organiques les plus divers, enfin les agents biologiques : contact avec une bactérie résistante. Dans tous les cas où le principe lytique aura subi une de ces actions, il ne pourra être question de la titrer par la méthode des dilutions.

renfermant les premières dilutions sont limpides mais les suivants sont troubles malgré qu'ils contiennent du bactériophage. Les résultats obtenus sont ainsi complètement faussés.

VI. — *Titrage de nos bactériophages.*

Technique employée. — La technique que nous employons tient compte des travaux antérieurs dont nous avons donné le compte rendu et des résultats que nous avons nous-même obtenus au cours des essais précédemment décrits. Voici comment nous opérons :

On prépare une série de tubes contenant chacun 9 c.c.³ de bouillon ordinaire à pH 7,8. Le premier reçoit 1 c.c.³ du filtrat bactériophage à titrer ; le deuxième reçoit 1 c.c.³ du contenu du premier tube que l'on a pris soin de bien agiter ; au troisième on ajoute de même 1 c.c.³ du contenu du deuxième et ainsi de suite jusqu'au onzième tube. Il est nécessaire de changer de pipette pour chaque prélèvement (1).

Chacun de ces tubes ainsi qu'un témoin sont inoculés avec une seule goutte de culture de 12 heures à 20° du microbe sensible. On laisse l'incubation se faire à 20° pendant la nuit et le lendemain matin on observe le résultat. Si par exemple le tube B₉ est limpide et le tube B₁₀ trouble, c'est que la suspension contenait de 1×10^9 à 9×10^9 corpuscules par centimètre cube.

Cet essai préliminaire étant fait, on recommence l'expérience mais cette fois, le dernier tube ayant lysé (le tube B₉ dans l'exemple choisi) est réparti dans dix tubes contenant chacun 9 c.c.³ de bouillon, à raison de 1 c.c.³ par tube. On inocule ces dix tubes au moyen d'une goutte de culture sensible de 12 heures et on compte le nombre des tubes limpides après incubation d'une nuit à 20°.

Si dans l'exemple choisi, on trouve par exemple 3 tubes limpides, c'est que le filtrat initial renfermait de 30×10^8 à 39×10^8 corpuscules par centimètre cube.

On pourrait encore améliorer la précision de la méthode en répartissant le contenu du tube B₉ dans 100 tubes ; on préciserait ainsi quel est le nombre exact d'unités lytiques compris entre 30×10^8 et 39×10^8 .

Ainsi que nous le verrons plus loin, il est nécessaire de faire plusieurs déterminations et de prendre la moyenne des chiffres obtenus.

(1) Nos pipettes sont bien dégraissées au mélange sulfochronique, lavées, séchées et stérilisées.

Résultats obtenus. — Nous avons appliqué, à titre d'exemple, la technique ci-dessus au titrage des filtrats bactériophage (B. Pb.) (B. Th.) (B. Coli) et (B. Pu.) dont nous avons donné la préparation au chapitre précédent. La souche sensible utilisée est le Coli « urinaire ».

Titrage de 4 filtrats bactériophages par la méthode des dilutions

NOM du bactériophage	Dernière dilution active	La dernière dilution active étant divisée dans 10 tubes Nombre de tubes limpides (moyenne de 4 expériences)	Titre calculé (nombre de corpuscules par cc3)
(B Th).....	B ₉	3	3×10^9
(B Coli).....	B ₈	2	2×10^8
(B Pb).....	B ₈	6	6×10^8
(B Pu.).....	B ₉	1	1×10^9

Lorsqu'on répète à plusieurs reprises le titrage d'une même suspension de bactériophage dans les conditions que nous venons de décrire, on constate que les résultats varient dans des proportions importantes d'une expérience à l'autre. Le tableau ci-dessous montre par exemple que le nombre trouvé peut varier du simple au triple si l'on se contente de faire un nombre restreint de déterminations. Il paraît donc nécessaire de faire plusieurs expériences et de prendre la moyenne des résultats trouvés.

**Titrage d'une suspension de bactériophages (B coli) au dépens
de la souche microbienne coli "urinaire"**

Dernière dilution active	B ₈ divisé en 10 tubes Nombre de tubes limpides	Titre calculé
B ₈	1	100×10^6
B ₈	3	300×10^6
B ₈	2	200×10^6
B ₈	2	200×10^6

VII. — Conclusions.

A la suite de ces essais, nous sommes conduits aux conclusions suivantes :

La méthode des dilutions ne peut être utilisée que lorsqu'il s'agit de dénombrer des corpuscules bactériophages très viru-

lents. Dans ce cas, il faut tenir compte des facteurs principaux suivants :

1° Opérer dans du bouillon ordinaire à pH 7,8 ;

2° Ensemencer chacune des dilutions (tubes de 10 c.c.³) et particulièrement les dernières avec très peu de microbes (150.000.000 dans nos expériences) ;

3° Laisser l'incubation se faire à la température du laboratoire (20°) et lire les résultats après une durée de 24 heures au maximum ;

4° Augmenter la précision de la mesure en répartissant la dernière dilution active, déterminée au cours d'une expérience préliminaire, dans 10 nouveaux tubes qui seront à leur tour éprouvés quant à leur teneur en principe lytique ;

5° Faire la moyenne de plusieurs déterminations.

Lorsqu'on veut évaluer des bactériophages moins actifs, il faut renoncer à cette méthode qui peut conduire à de très grosses erreurs.

Nous avons pu constater par contre que les chiffres obtenus en prenant la moyenne de plusieurs déterminations, sont comparables d'une expérience à l'autre.

★ ★

Avant d'aborder l'étude de la numération des corpuscules bactériologiques par les méthodes des plages sur gélose, nous allons exposer la technique de KRUEGER (244) basée sur un tout autre principe.

MÉTHODE DE KRUEGER

On sait que les facteurs qui influent sur l'éclaircissement d'une suspension microbienne en bouillon par le principe lytique sont : le nombre de phages présents, le nombre de microbes, les conditions de milieu et de température et enfin le temps.

KRUEGER opère dans des conditions toujours identiques, sur un même volume et avec un même nombre de microbes ; il trouve dans ces conditions que le temps nécessaire pour obtenir la limpidité absolue est proportionnel au nombre de corpuscules lytiques présents. La limpidité absolue est toutefois difficile à fixer rigoureusement ; l'auteur a préféré par la suite déterminer néphélométriquement le moment où il reste dans le tube d'expérience un résidu microbien fixé une fois pour toutes.

Des expériences préliminaires ayant permis d'établir la droite

qui représente les variations de temps aboutissant à la lyse partielle fixée, en fonction du nombre des corpuscules, il est facile de s'y reporter pour déterminer la teneur lytique d'un liquide à titrer. Il suffit pour cela de connaître le temps mis par un volume déterminé de ce liquide, à provoquer le degré de lyse voulu.

Cette méthode d'après KRUEGER donne une précision de $\pm 5\%$. Remarquons d'abord qu'elle ne peut convenir que lorsqu'il s'agit de titrer des suspensions d'un bactériophage donné agissant sur un même microbe. La vitesse de multiplication des corpuscules lytiques est en effet variable d'une race à l'autre et elle varie également suivant le microbe employé. Il ne peut non plus être question de l'employer pour des expériences de numération en valeur absolue mais seulement pour comparer la teneur lytique de deux suspensions de même origine agissant sur le même microbe.

La précision de $\pm 5\%$ que son auteur annonce, n'a qu'une valeur relative; elle dépend de la précision de la technique qui a permis d'établir la courbe primitive.

Signalons pour finir que cette manière d'opérer de KRUEGER a été suivie par CLIFTON (248) et par DEMIKHOVSKY (249) qui a apprécié le degré de lyse au moyen d'un néphélomètre photo-électrique.

DEUXIEME PARTIE

MÉTHODES DES PLAGES SUR GÉLOSE

Nous avons traité dans la première partie de ce chapitre, du titrage des bactériophages par la méthode des dilutions et nous avons vu que cette technique n'est possible que grâce à la nature corpusculaire des principes lytiques.

Il en est de même des méthodes de numération par formation de plages sur gélose dont nous allons maintenant parler.

A. — EXPOSÉ ET DISCUSSION DES TRAVAUX ANTÉRIEURS

Les diverses techniques que nous allons passer en revue se ramènent au fond à des modifications de celle de d'HÉRELLE ; c'est cette dernière qui a donné lieu au plus grand nombre de travaux et qui a été le plus largement appliqué. Pour ces raisons, nous lui avons donné le plus grand développement.

Les recherches effectuées par les différents auteurs ne se rapportent parfois que de façon indirecte au titrage des bactériophages ; certaines d'entre elles ayant seulement pour objectif la détermination des meilleures conditions de formation des plages. Nous avons crû utile de les mentionner afin d'être aussi complet que possible. A propos de certains points, nous avons apporté quelques remarques personnelles ou une courte discussion.

I. — MÉTHODE DE D'HÉRELLE.

a) *Technique.* — Lorsqu'en 1917 d'HÉRELLE publia son premier mémoire sur le bactériophage, il fit remarquer que l'obtention des plages sur gélose pouvait, en opérant sur des quantités mesurées, constituer une technique de numération des principes lytiques. Dans son livre publié en 1926 (61), se trouvent les indications suivantes que nous lui empruntons :

« Prenons la dilution 10^{-6} (obtenue en inoculant 1 c.c.³ de
« la suspension de bactériophage à titrer dans 9 c.c.³ de bouillon
« stérile puis ajoutant 1 c.c.³ de cette première dilution à 9 autres
« c.c.³ de bouillon stérile, etc...) inoculons 10 c.c.³ d'émulsion
« normale (250.000.000 de germes par c.c.³ de bacilles dysenté-
« riques avec 1 c.c.³ de cette première dilution : l'émulsion sera

« donc elle-même à une dilution de 10^{-7} de la suspension de bactériophages initiale. Etalons de suite sur 20 géloses, à raison d'une goutte normale (0 c.c.³ 05) par gélose, 1 c.c.³ de l'émulsion inoculée. Après incubation, on constate que chaque gélose est recouverte d'une culture en nappe de bacilles dysentériques parsemée de plages.

« Dans l'expérience citée, on a trouvé au total 478 plages pour les 20 boîtes. Les 478 « formateurs de plages » se trouvant dans 1 c.c.³ de la dilution 10^{-7} , on calcule que la suspension en renfermait 478×10^{-7} . »

Dans son dernier livre (90), d'HERELLE donne la technique suivante, légèrement modifiée par rapport à la précédente :

Prendre 4 tubes contenant 9 c.c. 5, 9 c.c., 9 c.c. 9, 9 c.c. 9 d'une culture bien trouble (18 à 24 h.) de la bactérie sensible. Dans le premier de ces tubes, introduire 0 c.c. 5 de filtrat dont on désire connaître la teneur en corpuscules bactériophages : on a une première dilution 1/20. Dans le second tube, introduire 1 c.c.³ du contenu du premier tube après qu'il a été soigneusement agité : dilution 1/200. Dans le troisième tube, introduire 0 c.c. 1 du second tube : dilution 1/20.000. Enfin, dans le quatrième tube, introduire 0 c.c. 1 du contenu du troisième tube : dilution 1/2.000.000.

Ces dilutions faites, prendre une boîte de Pétri et, avec un crayon gras, tracer sur le dos une croix qui délimite 4 quadrants.

Au moyen d'une boucle calibrée, prélever 0 c.c. 2 du premier tube et l'étaler soigneusement à la surface d'un quadrant sans laisser aucune place vide. Etaler de même une boucle du contenu du deuxième tube sur un second quadrant, puis une boucle du troisième tube sur le troisième quadrant et enfin, une boucle du quatrième tube sur le quatrième quadrant en laissant entre chaque quadrant une marge de 5 à 8 mm. de largeur. Placer la boîte de Pétri à l'étuve à 36°. Le lendemain, choisir le quadrant qui possède le plus grand nombre de plages isolées dont on fait la numération. Le nombre de corpuscules par c.c.³ du filtrat est alors facile à déterminer, puisque, comme on peut le calculer, 1 plage dans le 1^{er} quadrant représente 100 corpuscules par c.c.³

—	—	2 ^e	—	10.000	—	—
—	—	3 ^e	—	1.000.000	—	—
—	—	4 ^e	—	100.000.000	—	—

D'autres expérimentateurs ont employé l'une ou l'autre de ces techniques avec parfois quelques variantes. Nous citerons : BAIL (142), BRONFENBRENNER ET KORB (137), GRATIA (143), BERGS-

TRAND (139), GJORUP (144), ELIAVA et POZERSKI (145), GILDEMEISTER ET HERZBERG (146), ELLIS (147).

Ces auteurs se sont attachés aussi à déterminer les conditions optima de formation des plages en fonction des différents facteurs qui peuvent intervenir pour modifier soit leurs dimensions ⁽¹⁾, soit leur nombre.

Nous allons maintenant passer en revue cette partie de leurs travaux et apporter quelques remarques que nous avons faites.

b) *Influence de la teneur en gélose du milieu de culture.* — Si l'on fait l'étalement sur des boîtes de Pétri renfermant de la gélose à différentes concentrations variant de 5 ‰ à 25 ‰, on constate que les plages sont d'autant plus petites que la concentration en gélose est plus élevée. Ceci résulte des travaux de NAKAMURA (148). D'HÉRELLE (61) a montré que ce résultat est dû à l'accumulation des produits de la bactériophagie, qui diffusent d'autant moins bien que le milieu est plus consistant et qui, s'accumulant autour de la plage, gênent son développement ultérieur.

YEN (149) a pu confirmer ces expériences et a trouvé qu'on ne peut plus mettre en évidence aucune plage, lorsqu'on emploie 5 % d'agar.

Pour cet auteur, le nombre des plages obtenues au moyen d'une même dilution de bactériophage, peut varier d'un maximum 10 %, lorsqu'on utilise de la gélose à 0,5 % ou à 2 % toutes les autres conditions restant les mêmes.

D'après les expériences de NAKAMURA, le milieu le plus favorable serait constitué par un bouillon gélosé à 4 ‰. En pratique, un tel milieu ne peut être utilisé et d'HÉRELLE conseille l'emploi de gélose à 0,8 ou 1 % dans un bouillon ordinaire à pH 7,8.

c) *Influence de la quantité de microbes.* — Dans la technique de d'HÉRELLE que nous avons donnée plus haut, les dilutions de bactériophages se font dans des cultures microbiennes de 18 à 24 heures. Ce savant ne paraît pas attacher une grosse importance au nombre de microbes contenus dans ces cultures. La densité de l'émulsion, dit-il dans son livre, n'a pas la moindre influence, à condition toutefois que le nombre de bactériesensemencées sur la gélose, soit suffisant pour qu'après incubation,

— — —
(1) Les facteurs influençant la dimension des plages sont intéressants à envisager du point de vue de leur numération. Il est bien évident qu'il y a intérêt à augmenter si possible la dimension des plages afin de rendre la lecture plus facile et éviter que certaines d'entre elles puissent passer inaperçues.

la couche bactérienne soit continue ; s'il y avait des vides dans la couche bactérienne, les plages se distingueraient mal.

D'après GRATIA (143), BRONFENBRENNER et KOLB (137) et BURNET (150), le nombre des bactéries présentes influe sur le diamètre des plages produites, qui sont d'autant plus petites que le nombre des bactéries est plus élevé.

Si sur ce point les expérimentateurs sont d'accord, il n'en est pas de même sur celui qui concerne le nombre de plages produites par la même quantité de bactériophages lorsque le nombre des bactéries varie.

ASHESHOV (151), BRONFENBRENNER et KORB (137), d'HÉRELLE (152), MARSHALL (153), ont trouvé que le nombre des plages produites par une certaine quantité de bactériophage n'est pas affecté d'une manière appréciable par le nombre de bactéries. Les expériences de GRATIA (143), BURNET (150) et GJORUP (144) semblent au contraire indiquer qu'il n'en est pas ainsi et que le nombre des plages augmente avec le nombre des bactéries jusqu'à un maximum au delà duquel il diminue si l'augmentation des microbes se poursuit.

En 1933, DREYER et CAMPBELL-RENTON (154) ont repris cette étude ; ils ont préparé des dilutions différentes d'une culture microbienne âgée de 24 heures, qu'ils ont mises respectivement en présence d'une même quantité de bactériophage convenablement dilué. Ils ont constaté que le nombre de plages produites est fonction du nombre de bactéries et est d'autant plus important que ce dernier est lui-même plus élevé.

Nous décrirons plus loin le détail des expériences que nous avons effectuées à ce sujet à propos de la méthode de GRATIA. Nous avons vérifié que les conclusions en sont applicables à la méthode de d'HÉRELLE et que lorsque la concentration microbienne du mélange prêt à étaler est comprise entre 70 millions et 4 milliards de germes par centimètre cube, le nombre de plages obtenu avec une même quantité de principe lytique est sensiblement constant.

d) *Influence des microbes morts.* — On sait que dans toute culture microbienne, se trouvent un certain nombre de microbes morts dont le nombre augmente avec l'âge ; la présence de ces corps microbiens influence-t-elle le nombre des plages et dans quelle mesure ? Ce problème a été envisagé par plusieurs auteurs.

On sait aussi que le bactériophage est rapidement fixé par les bactéries sensibles vivantes ; les bactéries mortes conservent ce pouvoir de fixation à condition toutefois qu'elles n'aient pas subi

l'action d'une température supérieure à 100° MEISSNER (155), GOHS et JACOBSON (156).

BRONFENBRENNER et KORB (137) ont utilisé pour la formation de plages, un mélange de bactéries jeunes (culture de 18 h.) et de bactéries âgées, provenant d'une culture de 12 jours ; ils ont constaté que plus il y a de bactéries âgées, moins il y a de plages, qui sont en outre plus petites.

WOLLMANN et ses collaborateurs (157) travaillant sur le *B. subtilis*, le *B. dysentérique* et le staphylocoque et leurs bactériophages respectifs, ont constaté l'inactivation des bactériophages par les germes morts et ont souligné la cause d'erreur possible que ce facteur est susceptible d'apporter dans le titrage des bactériophages par la méthode de d'HÉRELLE.

e) *Influence de la sensibilité du microbe.* — Nous avons déjà signalé à propos de la méthode des dilutions, l'importance du choix de la souche microbienne devant servir au titrage des corpuscules lytiques. Il est bien évident que cette souche ne pourra être utilisable que si elle est très sensible à l'action de ces corpuscules.

GRATIA (158) a voulu voir si des cultures provenant de colonies isolées différentes de la même souche microbienne, produisent le même nombre de plages avec une même quantité de bactériophages ; l'expérience a montré qu'il n'en est rien et que chaque colonie se comporte à cet égard de façon différente. Comment expliquer ce résultat ? Pour BORDET (159) l'inégalité est en rapport avec le nombre d'individus microbiens sensibles existant dans les divers ensemencements. Il fait observer l'hétérogénéité des cultures et lui attribue le caractère parfois un peu capricieux des résultats observés.

Le même auteur a donné une preuve supplémentaire de l'influence du microbe sur les résultats de la numération des phages par la méthode des plages, en effectuant l'expérience suivante :

On part d'un bactériophage actif à la fois sur le *B. coli* et sur le *B. shiga* ; on en étale sur gélose une certaine dilution dont l'une des moitiés a été préalablement ensemencé en *Shiga* et l'autre en *coli*. Après incubation, on remarque qu'il y a davantage de plages du côté *coli* que du côté *shiga*.

Si le nombre des plages dépend à ce point de la souche microbienne, la notion du nombre de corpuscules présents dans une suspension de bactériophage va se trouver restreinte et il faudra la définir en spécifiant qu'il n'est valable que vis-à-vis d'un

microbe donné. En d'autres termes le nombre de corpuscules trouvé ne serait plus un nombre absolu mais relatif.

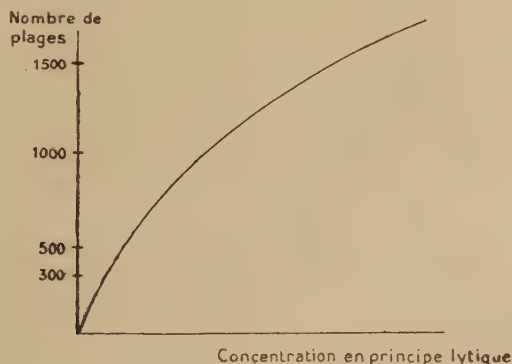
Dans les pages qui vont suivre, nous exposerons le détail des expériences que nous avons entreprises pour fixer ce point important.

f) *Proportionnalité entre le nombre des plages et le nombre des corpuscules.* — Pour d'HÉRELLE, il n'y a à ce sujet aucun doute : le nombre de plages qui se forment lorsqu'on étale sur gélose un volume déterminé d'un filtrat de bactériophage convenablement dilué et inoculé en germes microbiens, est proportionnel à la concentration de principe lytique primitif. Si par exemple 0 c.c.³ 05 d'une dilution à 10^{-3} produit 10 plages, le même volume de la dilution 10^{-4} produira 100 plages.

BRONFENBRENNER et KORB (137), BURNET (150), GJORUP (144) sont du même avis.

Cependant KLIGER et OLITZKI (160) n'ont pu vérifier ce résultat. Plus tard, DREYER et CAMPBELL RENTON (154) opérant au moyen d'une technique que nous décrirons plus loin, ont annoncé que la proportionnalité n'est pas rigoureuse et que le nombre de plages observées est relativement plus grand lorsqu'on utilise des dilutions de bactériophages élevées que lorsque celles-ci sont plus faibles. A titre d'exemple, les résultats suivants furent obtenus : une dilution au 1/512 donnait 35 plages alors que les dilutions au 1/256, 1/128, 1/64 et 1/32 donnaient respectivement 64, 102, 192 et 327 plages. Si la proportionnalité avait existé, on aurait dû trouver 70, 140, 280, 560 plages.

Ces expérimentateurs, grâce à leur technique, ont pu dénombrer jusqu'à 1.500 plages par plaque de gélose ; ils ont alors entrepris une étude de la question et, portant en abscisse les quantités de principe lytique et en ordonnées le nombre de plages, ils ont obtenu un tracé qui débute par une ligne droite qui bientôt s'infléchit et donne une courbe dont l'allure est représentée par la figure ci-contre.



Comment peut-on expliquer ce résultat ?

Les auteurs cités ont pensé que pour des concentrations élevées, plusieurs plages pouvaient confluer ; mais, ils ont bientôt abandonné cette façon de voir en remarquant que la déviation de la ligne droite commence à un moment où les plages sont encore distribuées de telle façon que toute confluence est impossible.

Nous nous demandons pour notre part si, lorsqu'on produit un grand nombre de plages sur une plaque de gélose, de surface relativement restreinte, la diffusion des produits de la lyse n'entrave pas le développement de corpuscules lytiques qui se seraient multipliés dans des conditions meilleures et auraient donné naissance à une plage. Le fait de l'empêchement de la lyse par les produits de la bactériophagie est bien connu ; par ailleurs, une expérience décrite dans le Mémoire de DREYER et CAMPBELL RENTON peut constituer un argument favorable à cette façon de voir. Ces bactériologues étudiant la vitesse de formation des plages ont trouvé que toutes ne se forment pas en même temps. Alors que certaines sont déjà visibles après une incubation de 3 heures à 37°, il en est d'autres qui ne se manifestent qu'après 7 heures. Les corpuscules qui ont donné naissance à ces dernières plages sont sans doute moins vigoureux et on conçoit qu'ils puissent être inhibés dans leur développement par un facteur défavorable tel que l'action des produits de lyse diffusant des plages déjà formées.

Cette différence entre le nombre théorique et le nombre réel des plages doit-elle nous faire abandonner la méthode ? Nous ne le croyons pas car il suffit de se placer dans les conditions où la proportionnalité existe, c'est-à-dire dans celles figurées par la portion rectiligne de la courbe de DREYERS, dans laquelle le liquide bactériophage est suffisamment dilué pour que l'on n'ait à compter qu'un petit nombre de plages.

g) *Influence de la qualité du bactériophage.* — En dehors des conditions du milieu, du choix et du nombre des microbes que nous avons vu jusqu'ici, un facteur important est à envisager : c'est celui de l'activité ou virulence du bactériophage.

Nous avons dit que la méthode des dilutions ne permet pas la numération de bactériophages peu actifs car des cultures résistantes se forment bientôt, qui masquent complètement le phénomène lytique. Les conclusions sont-elles les mêmes lorsqu'on utilise la méthode des plages ?

Lorsqu'on étale sur gélose, une goutte d'une dilution convenable d'une suspension de bactériophages faibles, en même temps qu'une goutte de culture d'une bactérie sensible à ce bactério-

phage, on constate après incubation, que les plages, si elles se produisent, sont de taille minuscule, comparable à des piqûres d'aiguilles faites à la surface de la couche microbienne.

Si l'on soumet la suspension de bactériophages ayant servi à cette expérience à un affaiblissement modéré par chauffage ou vieillissement, on constate cette fois qu'il n'est plus possible d'obtenir de plages sur gélose ou, si l'on en obtient, qu'elles sont de très petite taille. Et pourtant, de tels corpuscules lytiques devenus incapables de se manifester dans les conditions décrites, peuvent encore parfois produire un éclaircissement partiel de cultures microbiennes légères en bouillon (1).

La conclusion qui s'impose donc est que le titrage des corpuscules lytiques ne peut être effectué que lorsqu'ils sont suffisamment actifs pour donner des plages de taille appréciable.

A propos de leur dimension, nous venons de voir que, les autres conditions restant fixes, les plages sont plus grandes avec des bactériophages très actifs qu'avec des bactériophages faibles ; toutefois, pour un bactériophage donné, il n'est pas possible de dépasser un maximum, même en augmentant son activité par une série de passages ; ce maximum est par exemple de 2 ou 3 mm. de diamètre.

Certains principes lytiques sont capables de donner des plages de dimension beaucoup plus grandes, allant par exemple, dans le cas du *B. Coli* et dans les conditions décrites, jusqu'à un diamètre de 6 ou 7 millimètres. Ce sont les bactériophages dits à « grandes plages » qui sont caractérisés par une grande vitesse de multiplication.

Il est évident que pour ceux-ci, le dénombrement des plages sera facilité.

h) *Influence de l'Étalement.* — Lorsqu'on opère suivant la méthode de d'HÉRELLE, après avoir déposé une goutte de culture microbienne contenant un petit nombre de bactériophages, sur la surface d'une gélose séchée par un séjour de 24 heures à 37°, on l'étale au moyen d'une très fine tige de verre préalablement flambée.

NICOLLE (161) a montré que cette manipulation peut conduire à une diminution sensible du nombre des plages, diminution d'autant plus importante que le frottement a été plus prolongé. L'auteur cite les chiffres suivants : après 30 secondes d'étalement, le nombre des plages n'était plus que 79 % de celui donné par

(1) Il faut dans ce cas un nombre de bactériophages plus grand que celui des microbes soumis à leur action.

les tubes témoins ensemencés sans étaleur. Après 10 minutes, il atteignait seulement 11,4 %.

Dans ce phénomène, seul le bactériophage est en cause ; il est d'autant plus facilement détruit que ses dimensions propres sont plus grandes.

La bactérie n'est pas influencée par l'action de l'étaleur ; toutefois, le bactériophage est nettement plus sensible si l'étalement se fait en présence de la bactérie que s'il est frotté seul.

NICOLLE propose une technique qui permet d'éviter cet inconvénient. Voici le mode opératoire : Deux gouttes d'eau physiologique sont étendues rapidement avec l'étaleur à la surface de la gélose d'une boîte de PETRI ; on fait tomber au centre, une goutte de la dilution du filtrat et 2 gouttes de la suspension bactérienne. Par un mouvement combiné de balancement et de rotation, on étend le liquide sur la surface entière de la gélose mouillée. La couche liquide pénètre rapidement dans la gélose et, après une heure à la température du laboratoire, on peut mettre à incuber à l'étuve.

La partie délicate de cette manipulation nous a paru être l'étalement régulier des gouttes de culture microbienne et de la goutte de bactériophage sur la partie de gélose mouillée par le sérum physiologique. Nous sommes parvenus à répartir notre liquide à la surface de la gélose mais avec un peu de difficulté.

Malgré le manque de régularité de notre étalement, nous avons pu constater comme NICOLLE que l'usage de l'étaleur a une influence très nette sur le nombre des plages. Une certaine dilution du bactériophage (B. Pb.) agissant sur le coli « urinaire » nous a donné par la méthode de d'HÉRELLE (1) 100 plages pour une goutte normale alors que par la méthode de NICOLLE nous avons obtenu 217 plages.

i) *Autres facteurs.* — Nous avons jusqu'ici passé en revue les facteurs principaux qui peuvent fausser les résultats donnés par la méthode de numération de d'HÉRELLE. D'autres, moins importants, doivent aussi être mentionnés.

En premier lieu, citons l'adsorption des bactériophages par les parois des pipettes servant à la dilution. Dans les conditions décrites par d'HÉRELLE et que nous avons rappelées au début de ce chapitre, cette adsorption ne paraît pas importante et de nature à modifier le résultat d'une façon très sensible. Cependant, si l'on opère sur des suspensions renfermant seulement un petit

(1) L'étalement a été fait avec une tige de verre coudée de 2 mm. de diamètre et 35 mm. de longueur. Nous avons effectué trois aller et retour.

nombre de corpuscules, il peut y avoir là une cause d'erreur non négligeable.

Autre cause d'erreur : On se rappelle que dans la technique de d'HÉRELLE, lorsqu'on a préparé la dernière dilution, on prélève 0,2 c.c.³ du liquide au moyen d'une boucle calibrée puis, on l'étale à la surface d'une gélose. KNORR et RUFF (162) estiment que le volume prélevé de la sorte est variable et préfèrent l'emploi de pipettes capillaires.

Certes, en opérant ainsi, ces auteurs doivent mesurer le volume de liquide à étaler avec une plus grande précision ; mais, n'introduisent-ils pas en revanche, l'erreur due à l'adsorption par le verre de leurs pipettes ?

★★

MOLINA (163) a apporté une légère modification à la technique de d'HÉRELLE. Il recommande d'employer une gélose nutritive dans laquelle, après liquéfaction et refroidissement vers 45°, on incorpore une purée de germes sensibles. Après dessiccation de la surface à l'étuve, on étale le liquide bactériophage. Le seul avantage paraît être la bonne répartition des germes.

★★

j) *Conclusion relative à la méthode de d'Hérelle.* — En somme, la méthode de d'HÉRELLE exige les conditions suivantes :

1°) Emploi d'une gélose aussi molle que possible. — Cette condition est limitée par le manque de solidité qui en résulte. On préconise habituellement une concentration en agar de 1 % ;

2°) Le nombre de microbes étalés sur la gélose doit être suffisant pour produire une nappe uniforme ;

3°) La culture microbienne employée doit être une culture jeune (24 h. au maximum) ;

4°) La souche microbienne doit être très sensible au bactériophage à titrer ;

5°) La dilution du principe lytique doit être telle que le nombre de plages produites ne soit pas trop grand. (Une centaine de plages sur la surface de la gélose d'une boîte de PÉTRI de 10 cm. de diamètre paraît être un ordre de grandeur convenable) ;

6°) La méthode n'est applicable que si le bactériophage à titrer est suffisamment virulent ;

7°) Le frottement de la baguette de verre qui sert à l'étalage, doit être réduit au minimum. Il s'ensuit néanmoins une erreur que l'on peut éviter en opérant suivant les indications de

NICOLLE. Cette modification, excellente dans son principe, nous a cependant paru difficile à mettre en œuvre.

Les conditions ci-dessus étant remplies, deux causes d'erreur principales interviennent pour diminuer la précision de la méthode : ce sont d'une part l'influence de l'étalement que nous venons de signaler et d'autre part la mesure du très petit volume de liquide destiné à cet étalement.

II — MÉTHODE DE DREYERS ET CAMPBELL-RENTON (154).

Cette méthode est, comme celle de d'HÉRELLE, basée sur la formation de plages sur gélose. On utilise pour cela un dispositif spécial dont voici la description.

On prend des plaques de verre de 107 mm. × 82 mm. et, au moyen d'un diamant, on trace un rectangle dont les bords sont parallèles à ceux de la plaque et à environ 6 mm. en retrait. Ces traits serviront à empêcher l'étalement de la gélose au delà de la limite qu'ils fixent. On dispose d'un cadre amovible constitué par 4 bandes d'aluminium munies chacune de 2 crampons permettant la fixation sur la plaque de verre. Celle-ci et son cadre, peuvent prendre place dans une boîte de PETRI de 14 cm. de diamètre et 2 cm. de profondeur dont le couvercle poreux (1) permet l'évaporation de la vapeur d'eau en excès. Le tout est placé sur une plaque chauffante munie de vis calantes et d'un niveau d'eau permettant d'obtenir l'horizontale.

L'ensemble stérilisé étant en place et chauffé par le support, on verse doucement 8,4 c.c. de gélose fondue à 17 % sur le centre de la plaque de verre et, par des mouvements convenables, on l'étale dans la partie limitée par le cadre et les traits tracés sur le verre. On laisse alors au repos de façon à obtenir une surface bien plane ; on recouvre d'une cloche de verre et on laisse refroidir. On place alors la plaque en milieu humide, dans une boîte de PETRI stérile dont le fond est muni d'une double couche de papier filtre imbibé d'eau et également stérile. L'utilisation se fait dans les 24 heures.

L'ensemencement se fait en faisant couler 6 à 10 c.c.³ de culture de 24 heures du germe sensible à la surface de la gélose que l'on a préalablement placée en position inclinée ; on maintient dans cette position quelques minutes de façon à obtenir l'écou-

(1) Ce couvercle est constitué par un anneau de laiton de 15 cm. de diamètre et d'une hauteur de 2 cm. 8 au-dessus duquel se trouve un morceau circulaire de tissu de filasse blanche. Pour tenir ce tissu, on utilise un deuxième anneau s'adaptant exactement sur le premier. Ce dispositif ressemble assez à celui utilisé pour maintenir en place un tissu de broderie.

lement de l'excès du liquide. De cette façon, on obtient une plaqueensemencée uniformément.

On procède alors au séchage de la surface, qui se fait en plaçant la plaqueensemencée, dans la boîte de PÉTRI munie du couvercle poreux et en mettant le tout à l'étuve à 37°.

Ainsi préparée, la surface de la gélose est prête à recevoir le bactériophage qui va donner naissance aux plages. Pour cela, on prépare plusieurs dilutions du principe lytique et on met avec précaution une petite goutte de chacune d'elles à différents points de la gélose. Cette opération se fait au moyen d'anses de platine calibrées. Les gouttes de liquide s'étalent sur une aire de 7 mm. de diamètre. On peut mettre sur chaque plaque 12 gouttes de la dilution de bactériophage.

Après avoir mis le bactériophage sur la plaque, on la place dans la boîte de PÉTRI dont le fond est garni de papier filtre imbibé d'eau et on met à l'étuve 18 à 20 heures à 37°. De la sorte, l'incubation se fait dans une atmosphère saturée d'humidité qui empêche le dessèchement de la plage.

Les plages obtenues de cette façon sont extrêmement petites et leur numération directe ne peut être faite qu'au microscope ; mais ce travail est assez difficile et les auteurs préfèrent photographier la plaque de gélose et procéder ensuite à l'agrandissement du cliché obtenu (32 à 35 fois). La lecture peut alors se faire à l'œil nu. On peut arriver à compter de cette façon 1.500 plages sur chaque aire.

Cette méthode est plus compliquée que celle de d'HÉRELLE et en revanche, elle ne paraît pas présenter d'avantages. La formation d'un grand nombre de plages sur une très petite surface paraît au contraire être un inconvénient qui a conduit les auteurs à admettre que la proportionnalité entre le nombre de corpuscules bactériophages et le nombre de plages, n'existe pas. Nous avons déjà discuté ce fait au cours de ce chapitre ; nous n'insisterons donc pas.

III. — MÉTHODE DE YEN.

YEN (149) a décrit une technique qui évite la cause d'erreur qui, dans la méthode de d'HÉRELLE, se produit lors de l'étalement. Voici comment il opère :

On introduit dans une boîte de PÉTRI stérile de 15 cm. de diamètre : 1 c.c.³ de bactériophage dilué en bouillon pH 7,6 et 0,5 c.c. de liquide obtenu en émulsionnant une culture microbienne de 18 heures sur gélose inclinée, dans 50 c.c.³ de bouillon.

On verse alors 10 c.c.³ d'agar à 15 %, fondu et refroidi vers 45°.

On mélange soigneusement et, après refroidissement, on laisse incuber 24 heures à 37°.

On obtient ainsi 2 sortes de plages : celles de surface qui sont larges et claires et celles qui sont situées dans la masse de la gélose et qui sont plus petites et moins nettement bordées.

Cette façon d'opérer donne des résultats satisfaisants à son auteur. Les seules objections qu'on peut lui faire sont d'une part le fait que les plages se forment dans une gélose dont la concentration finale est voisine de 14 %, ce qui est beaucoup ; d'autre part, les plages situées dans la profondeur de la gélose sont difficiles à dénombrer parce que peu nettes.

Une méthode qui paraît éviter les inconvénients des précédentes et tenir compte au maximum des conditions les plus favorables à la formation des plages est celle que GRATIA a publiée en 1936 et dont nous allons maintenant parler.

(V. — MÉTHODE DE GRATIA.

GRATIA (164) étale sur la gélose contenue dans une boîte de PETRI, non plus comme le fait d'HERELLE, une goutte de suspension de bactériophages additionnée de microbes, mais 1 c.c.³ d'un mélange préalablement préparé de culture microbienne, de bactériophage dilué et de gélose fondue.

Voici les indications données par l'auteur :

On part de 3,5 c.c. d'une émulsion en eau peptonée du microbe sensible ; on ajoute 0,5 c.c. de dilution convenable de suspension de bactériophage et on ajoute 1 c.c.³ de gélose à 2,5 % préalablement fondue.

On prélève aussitôt 1 c.c.³ de ce mélange qu'on verse à la surface d'une boîte de PETRI contenant déjà une couche épaisse de gélose nutritive solide. Le mélange s'étale spontanément à la surface de celle-ci ; lorsque la couche mince est solidifiée à la surface de la gélose, on place la boîte de PETRI retournée à l'étuve.

Les avantages de cette technique apparaissent immédiatement : tout d'abord, les plages se forment dans un milieu de consistance très molle qui, ainsi que nous l'avons vu, est tout à fait favorable à leur développement.

On n'a pas à craindre le manque de solidité du substrat puisque celui-ci est supporté par une couche de gélose plus ferme.

La diffusion des produits résultant de la bactériophagie se fait dans la masse de gélose ferme et ainsi, ils ne peuvent nuire au développement des plages.

En dehors de cela, la méthode de GRATIA n'a aucun des inconvénients de la méthode de d'HÉRELLE que nous avons signalés et qui sont : destruction de bactériophage par étalement et manque de précision dans la mesure du très petit volume qui est étalé sur gélose.

Cette technique n'a pas non plus l'inconvénient de celle de YEN qui, nous l'avons vu, réside en la formation de plages peu nettes à l'intérieur de la gélose.

Nous avons utilisé la méthode de GRATIA avec de bons résultats que nous allons maintenant exposer.

B. — TRAVAUX PERSONNELS

De l'exposé que nous venons de faire, il résulte que la méthode de GRATIA est celle qui paraît offrir le plus de précision. Dans ce travail nous nous sommes proposés de déterminer les meilleures conditions d'application de cette technique et pour cela, nous avons étudié les facteurs qui nous ont paru pouvoir intervenir dans son exécution.

Nous avons déjà mentionné et discuté dans la première partie de ce chapitre, certains de ces facteurs qui ont été envisagés avant nous à propos de la méthode de d'HÉRELLE.

Nous précisons ici leur influence sur la méthode de GRATIA.

Nous donnerons donc dans les pages qui suivent d'abord le détail du mode opératoire que nous avons employé et qui diffère très légèrement de celui de GRATIA ; nous continuerons par l'examen de l'influence du nombre de microbes ensemencés et de la présence de microbes morts sur les résultats donnés par la technique ; nous verrons ensuite s'il y a, ou non, proportionnalité entre le nombre de plages produites et la quantité de bactériophage réellement présente. Après avoir examiné l'importance de la souche microbienne sensible, nous discuterons de la précision de la méthode et cela nous amènera à faire la comparaison des résultats donnés dans les mêmes conditions par les trois techniques : dilutions — plages d'après d'HÉRELLE — plages d'après GRATIA.

I. — *Technique utilisée.*

Les conditions exactes décrites par GRATIA nous ont paru assez difficiles à mettre en œuvre de façon satisfaisante : lorsqu'en effet on mélange dans un tube à essais stérile 3,5 c.c. d'émulsion microbienne, 0,5 c.c. de bactériophage dilué et 1 c.c.³ de gélose à 2,5 % préalablement fondue, il est difficile même en réchauf-

fant la gélose vers 50° d'obtenir un liquide exempt de grumeaux. Nous préférons employer une gélose moitié moins riche (1,25 %) et en mettre le double.

Nous préparons donc dans un tube à essais stérile, le mélange suivant : 1 c.c.³ de bactériophage dilué (1), 1 c.c.³ de culture microbienne et 1 c.c.³ de bouillon (2). Nous plongeons quelques instants le tube dans un bain d'eau à 46°-48°, nous y introduisons 2 c.c.³ de gélose à 1,25 % préalablement fondue et conservée dans le même bain d'eau (3). Le mélange effectué, on en prélève de suite 1 c.c.³ au moyen d'une pipette que l'on réchauffe légèrement par passage dans la flamme d'un brûleur. Cette prise est étalée immédiatement à la surface d'une boîte de PETRI de 10 cm. de diamètre renfermant de la gélose à 15 % et préalablement réchauffée par séjour à l'étuve à 37°.

On laisse refroidir 15 minutes et on place à l'étuve en position retournée. La lecture peut déjà se faire après 6 heures d'incubation.

Dans le cas de bactériophages moyennement ou faiblement actifs, il est préférable de laisser l'incubation s'effectuer à la température de 18° ou 20°. On obtient dans ces conditions et après 12 heures des plages très nettes et très faciles à dénombrer.

II. — *Influence du nombre de microbes ensemencés.*

Nous avons vu à propos de la méthode de d'HÉRELLE que pour certains expérimentateurs, le nombre des plages varie avec le nombre des microbes ensemencés. Pour d'autres, au contraire, ce facteur est sans influence pourvu que les germes soient en quantité suffisante pour donner sur la gélose, après incubation, une nappe de culture continue.

Il nous a paru intéressant de rechercher si le nombre de microbes joue un rôle dans le résultat d'expériences de numération de bactériophages, obtenu dans les conditions décrites ci-dessus.

A cet effet, nous avons préparé une suspension concentrée de germes de la souche sensible « coli urinaire ». Pour cela, nous

(1) Nous avons vu à propos de la méthode des dilutions et de celle de d'HÉRELLE que seuls les bactériophages doués d'une virulence suffisante peuvent être titrés par l'une ou l'autre technique. Il en est de même si l'on emploie le procédé de GRATIA.

(2) On peut aussi, bien entendu, supprimer le bouillon et mettre davantage de culture microbienne ou de bactériophage.

(3) Lorsqu'on fait une série d'expériences un peu longue, il y a intérêt à porter de temps en temps la gélose à 100° afin d'éviter la gélification lente qui a tendance à se produire à la température de 46-48°. Bien entendu, avant l'emploi on la refroidit de nouveau à 46-48°.

avons émulsionné dans 25 c.c. de bouillon ordinaire, les nappes microbiennes se trouvant sur la gélose de 4 tubes de culture de 24 heures. Cette émulsion a été homogénéisée par agitation dans un petit ballon en verre pyrex contenant des perles de verre. Un prélèvement a permis de déterminer le titre en germes vivants [d'après Alice KAPLAN (165)]; le résultat connu ultérieurement a été 7×10^9 germes par c.c.³.

Nous avons préparé les mélanges dont la teneur est indiquée dans le tableau VIII ci-après ⁽¹⁾ (p. 100). Ce tableau mentionne le nombre de plages obtenues par chacun des mélanges.

Comme on le voit, dans les limites où nous avons opéré, le nombre des microbes n'exerce aucune influence sur le nombre des plages. Il n'en est pas de même sur la dimension de ces plages : on observe en effet que plus le nombre de germes vivants est grand, plus les plages sont petites. Il n'y a pourtant pas intérêt à trop réduire le nombre de microbes car alors les plages sont moins nettement marquées ; leurs bords au lieu d'être bien tranchés sont un peu diffus. Ce fait rend la lecture moins aisée et peut laisser inaperçues quelques petites plages qui sont parfois accolées à d'autres de plus grande taille.

La concentration microbienne qui nous a paru la meilleure dans ces expériences est celle qui est comprise entre 7×10^8 et $1,4 \times 10^9$ germes par c.c.³ du mélange prêt à étaler.

III. — *Influence des microbes morts.*

Nous avons aussi signalé à propos de la méthode de d'HERELLE l'influence défavorable des microbes morts dans la formation des plages. Cette influence s'exerce vraisemblablement par un processus d'adsorption des corpuscules bactériophages, qui empêche leur activité de se manifester.

Nous avons pu vérifier, ainsi qu'en témoigne le tableau ci-après, que les microbes morts diminuent considérablement et d'autant plus qu'ils sont plus nombreux, le nombre des plages obtenues sur gélose par la méthode de GRATIA (tabl. IX, p. 101).

Ces résultats montrent que si l'on veut effectuer de façon correcte le titrage des principes lytiques, par la technique de GRATIA, il est indispensable d'employer des cultures microbiennes aussi jeunes que possible, qui contiennent le minimum de germes morts.

(1) Les mentions B 5 et B 4 qui figurent sur ce tableau signifient qu'il s'agit des dilutions du bactériophage initial aux titres respectifs de $\frac{1}{10^5}$ et $\frac{1}{10^4}$.

TABLEAU VIII

Influence du nombre de microbes vivants dans la numération des bactériophages par la méthode de Gratia

Composition du mélange	Teneur en germes vivants par cc ³	Dilution du bactériophage par cc ³	Nombre de plages observé
0 cc. 1 B 4 2 cc. 9 émulsion microb. 2 cc. gélose à 1.25 %	$4,06 \times 10^9$	$\frac{1}{5 \times 10^5}$	317
0 cc. 1 B 4 2 cc. 5 émulsion microb. 0 cc. 4 bouillon 2 cc. gélose à 1.25 %	$3,5 \times 10^9$	$\frac{1}{5 \times 10^5}$	329
0 cc. 1 B 4 2 cc. 2 émulsion microb. 0 cc. 7 bouillon 2 cc. gélose à 1.25 %	$3,08 \times 10^9$	$\frac{1}{5 \times 10^5}$	332
1 cc. B 5 2 cc. émulsion microb. 2 cc. gélose à 1.25 %	$2,8 \times 10^9$	$\frac{1}{5 \times 10^5}$	308
1 cc. B 5 1 cc. 7 émulsion microb. 0 cc. 3 bouillon 2 cc. gélose à 1.25 %	$2,38 \times 10^9$	$\frac{1}{5 \times 10^5}$	314
1 cc. B 5 1 cc. 5 émulsion microb. 0 cc. 5 bouillon 2 cc. gélose à 1.25 %	$2,4 \times 10^9$	$\frac{1}{5 \times 10^5}$	336
1 cc. B 5 1 cc. 2 émulsion microb. 0 cc. 8 bouillon 2 cc. gélose à 1.25 %	$1,68 \times 10^9$	$\frac{1}{5 \times 10^5}$	318
1 cc. B 5 1 cc. émulsion microb. 1 cc. bouillon 2 cc. gélose à 1.25 %	$1,4 \times 10^9$	$\frac{1}{5 \times 10^5}$	325
1 cc. B 5 0 cc. 7 émulsion microb. 1 cc. 3 bouillon 2 cc. gélose à 1.25 %	$0,98 \times 10^9$	$\frac{1}{5 \times 10^5}$	314
1 cc. B 5 0 cc. 5 émulsion microb. 1 cc. 5 bouillon 2 cc. gélose à 1.25 %	$0,7 \times 10^9$	$\frac{1}{5 \times 10^5}$	316
1 cc. B 5 0 cc. 4 émulsion microb. 1 cc. 6 bouillon 2 cc. gélose à 1.25 %	$0,56 \times 10^9$	$\frac{1}{5 \times 10^5}$	307
1 cc. B 5 0 cc. 3 émulsion microb. 1 cc. 7 bouillon 2 cc. gélose à 1.25 %	$0,42 \times 10^9$	$\frac{1}{5 \times 10^5}$	322
1 cc. B 5 0 cc. 2 émulsion microb. 1 cc. 8 bouillon 2 cc. gélose à 1.25 %	$0,28 \times 10^9$	$\frac{1}{5 \times 10^5}$	317
1 cc. B 5 0 cc. 1 émulsion microb. 1 cc. 9 bouillon 2 cc. gélose à 1.25 %	$0,14 \times 10^9$	$\frac{1}{5 \times 10^5}$	305
1 cc. B 5 0 cc. 0,5 émulsion microb. 1 cc. 95 bouillon 2 cc. gélose à 1.25 %	$0,07 \times 10^9$	$\frac{1}{5 \times 10^5}$	318

TABLEAU IX

Influence des microbes morts⁽¹⁾ sur le nombre des plages formées sur gélose

(Technique de Gratia)

Expérience effectuée avec le coli "urinaire" et le bactériophage (B. Pb)

COMPOSITION DU MÉLANGE	NOMBRE de germes vivants par cc ³	NOMBRE de germes morts par cc ³	CONCEN- TRATION en principe lytique initial par cc ³	NOMBRE de plages
1 cc ³ B ₅ 2 cc ³ émulsion microbes vivants 2 cc ³ gélose à 1.25 %	1.6×10^9		$\frac{1}{5 \times 10^5}$	205
1 cc. B ₅ 1 cc. 7 émulsion microbes vivants 0 cc. 3 émulsion microbes morts 2 cc. gélose à 1.25 %	1.36×10^9	0.24×10^9	$\frac{1}{5 \times 10^5}$	153
1 cc. B ₅ 1 cc. 5 émulsion microbes vivants 0 cc. 5 émulsion microbes morts 2 cc. gélose à 1.25 %	1.2×10^9	0.4×10^9	$\frac{1}{5 \times 10^5}$	129
1 cc. B ₅ 1 cc. 2 émulsion microbes vivants 0 cc. 8 émulsion microbes morts 2 cc. gélose à 1.25 %	0.96×10^9	0.64×10^9	$\frac{1}{5 \times 10^5}$	95
1 cc. B ₅ 1 cc. émulsion microbes vivants 1 cc. émulsion microbes morts 2 cc. gélose à 1.25 %	0.8×10^9	0.8×10^9	$\frac{1}{5 \times 10^5}$	102
1 cc. B ₅ 0 cc. 7 émulsion microbes vivants 1 cc. 3 émulsion microbes morts 2 cc. gélose à 1.25 %	0.56×10^9	1.04×10^9	$\frac{1}{5 \times 10^5}$	83
1 cc. B ₅ 0 cc. 5 émulsion microbes vivants 1 cc. 5 émulsion microbes morts 2 cc. gélose	0.4×10^9	1.2×10^9	$\frac{1}{5 \times 10^5}$	77

(1) Une partie de l'émulsion de microbes vivants a été chauffée 1/2 heure à 70°.

IV. — Proportionnalité entre le nombre de plages et la quantité de bactériophage.

Un autre point qu'il nous faut envisager est celui de la proportionnalité entre le nombre de plages et la quantité de principe lytique présent.

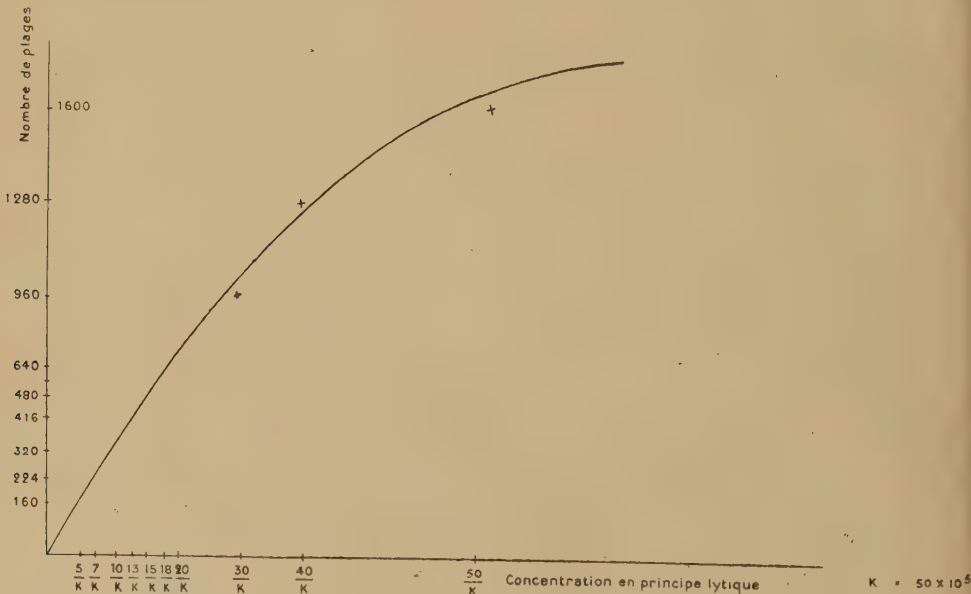
Nous avons déjà discuté ce sujet à propos de la méthode de d'HÉRELLE et nous avons vu que si, pour certains auteurs, la proportionnalité ne fait pas de doute, d'autres estiment qu'elle n'existe que lorsque le principe lytique est suffisamment dilué.

Il nous importe ici de savoir si, lorsqu'on veut dénombrer les corpuscules bactériophages présents dans un liquide par la méthode de GRATIA, on peut employer une dilution ou une autre sans craindre d'influencer le résultat. En d'autres termes, dans les conditions décrites, la proportionnalité existe-t-elle et dans quelles limites ?

On trouvera ci-après le tableau X donnant les résultats des expériences que nous avons faites en faisant varier la quantité de bactériophage — tous les autres facteurs restant fixes.

Les chiffres indiqués sur ce tableau montrent que la proportionnalité existe entre la concentration du liquide bactériophage et le nombre de plages observées à condition de ne pas dépasser une certaine limite qui est ici aux alentours de 600 plages (boîte de PETRI de 100 mm. de diamètre).

Ces résultats confirment ceux qui ont été donnés par DREYERS et CAMPBELL-RENTON. Du point de vue qui nous occupe, ils nous montrent que la numération des bactériophages par la méthode de GRATIA peut donner de bons résultats avec diverses dilutions du liquide lytique à condition que le nombre de plages formées ne soit pas trop élevé (maximum 600 dans les conditions de nos expériences).



La courbe ci-dessus traduit ces résultats.

V. — Influence de la souche microbienne.

Pour terminer, nous avons voulu voir s'il est indifférent d'utiliser une souche quelconque de microbe sensible ou si les résultats obtenus sont les mêmes quelle que soit cette souche.

TABLEAU X

Nombre de plages en fonction de la quantité de principe lytique

Expérience faite avec coli "urinaire" et (B Pb)

COMPOSITION du mélange	NOMBRE de microbes par cc ³	DILUTION du Bgc. dans 1 cc. du mélange	NOMBRE de plages observées par étal ^t de 1 cc. du mél.	NOMBRE théorique de plages d'après le 1 ^{er} résultat
0 cc. 5 B5 1 cc. 5 bouillon 1 cc. émulsion microb. 2 cc. gélose à 1.25 %	1.4×10^9	$\frac{5}{10 \times 5 \times 10^5}$	160	160
0 cc. 7 B5 1 cc. 3 bouillon 1 cc. émulsion microb. 2 cc. gélose à 1.25 %	1.4×10^9	$\frac{7}{10 \times 5 \times 10^5}$	238	224
1 cc. B5 1 cc. bouillon 1 cc. émulsion microb. 2 cc. gélose à 1.25 %	1.4×10^9	$\frac{10}{10 \times 5 \times 10^5}$	325	320
1 cc. 3 B5 0 cc. 7 bouillon 1 cc. émulsion microb. 2 cc. gélose à 1.25 %	1.4×10^9	$\frac{13}{10 \times 5 \times 10^5}$	430	416
1 cc. 5 B5 0 cc. 5 bouillon 1 cc. émulsion microb. 2 cc. gélose à 1.25 %	1.4×10^9	$\frac{15}{10 \times 5 \times 10^5}$	502	480
1 cc. 8 B5 0 cc. 2 bouillon 1 cc. émulsion microb. 2 cc. gélose à 1.25 %	1.4×10^9	$\frac{18}{10 \times 5 \times 10^5}$	549	576
2 cc. B5 1 cc. émulsion microb. 2 cc. gélose à 1.25 %	1.4×10^9	$\frac{20}{10 \times 5 \times 10^5}$	589	640
0 cc. 3 B4 1 cc. 7 bouillon 1 cc. émulsion microb. 2 cc. gélose à 1.25 %	1.4×10^9	$\frac{30}{10 \times 5 \times 10^5}$	820	960
0 cc. 4 B4 1 cc. 6 bouillon 1 cc. émulsion microb. 2 cc. gélose à 1.25 %	1.4×10^9	$\frac{40}{10 \times 5 \times 10^5}$	1016	1280
0 cc. 5 B4 1 cc. 5 bouillon 1 cc. émulsion microb. 2 cc. gélose à 1.25 %	1.4×10^9	$\frac{50}{10 \times 5 \times 10^5}$	1123	1600
0 cc. 7 B4 1 cc. 3 bouillon 1 cc. émulsion microb. 2 cc. gélose à 1.25 %	1.4×10^9	$\frac{70}{10 \times 5 \times 10^5}$	1418	2240
1 cc. B4 1 cc. bouillon 1 cc. émulsion microb. 2 cc. gélose à 1.25 %	1.4×10^9	$\frac{100}{10 \times 5 \times 10^5}$	incomptable	3200

Nous avons opéré au moyen des bactériophages (B. Pb), (B. Th) et (B. Coli) qui agissent également bien sur les souches de coli « urinaire » et « val 2 ».

Nous avons préparé des émulsions de même concentration de ces deux microbes et, au moyen de la même dilution de chacun de ces bactériophages, nous avons fait des plages en opérant exactement comme nous l'avons décrit à propos des expériences précédentes (1). Le tableau XI-ci-dessous donne les résultats obtenus.

TABLEAU XI

NOM de la souche microbienne	B. PB. 1 ^{re} expérience	B. PB. 2 ^{me} expérience	B. Coli	B. "Th"
"Urinaire"	236 plages	277 plages	59 plages	125 plages
"Val 2"	335 plages	387 plages	108 plages	218 plages

Comme on le voit, les résultats sont assez différents suivant la souche microbienne employée ; le nombre de plages est beaucoup plus important dans les 3 cas avec la souche « val 2 » qu'avec la souche « urinaire ».

Ainsi que nous l'avons déjà fait remarquer, ce fait apporte une limitation à la notion du nombre absolu de corpuscules contenu dans une suspension de bactériophages ; mais il n'intervient pas lorsqu'il s'agit de déterminer un nombre relatif de principes lytiques se reproduisant aux dépens d'un même microbe. C'est d'ailleurs dans ces conditions qu'ont été faites les expériences de numération publiées par les différents auteurs.

VI. — Précision de la méthode.

Pour apprécier la précision de cette technique, nous ne pouvons que comparer entre eux les résultats extrêmes obtenus ou encore les comparer à ceux donnés par les autres méthodes en utilisant la même souche microbienne.

Nous avons pu constater que les chiffres extrêmes obtenus par la méthode de GRATIA ne diffèrent jamais de plus de 15 % au cours de plusieurs expériences de numération. Le plus souvent leur écart ne dépasse même pas 10 %.

Afin de pouvoir comparer les résultats donnés par la technique de GRATIA à ceux donnés par celle de d'HÉRELLE et celle des dilutions, nous avons titré une même suspension de notre bacté-

(1) Les mélanges étalés sur gélose (1 c.c.³) contenaient : 1 c.c.³ de bactériophage dilué (B. 5 pour B. Pb et B. 6 pour les autres) ; 2 c.c.³ de culture microbienne à 3 milliards et 2 c.c.³ de gélose à 1,25 %.

riophage (*B. coli*) par chacune des 3 techniques. Pour donner plus de précision à nos mesures, nous avons effectué dans chaque cas 4 déterminations.

L'expérience faite par la méthode de d'HÉRELLE l'a été en suivant exactement le mode opératoire dont nous avons donné le détail au début de cette deuxième partie. Nous croyons bon toutefois d'ajouter ici, au sujet de la préparation des milieux, quelques détails supplémentaires que nous n'avons pas trouvés dans les publications.

D'HÉRELLE recommande d'utiliser des boîtes de PETRI renfermant de la gélose bien sèche; nous arrivons à ce résultat en versant la gélose fondue dans des boîtes préalablement chauffées à l'étuve vers 50°. Dès que la prise est effectuée et sans attendre le refroidissement complet, nous mettons les boîtes à l'étuve en les retournant. De cette façon, le couvercle ne peut se conduire comme une paroi froide et il n'y a pas de condensation d'eau à sa surface. Après 24 heures d'étuve, les milieux sont prêts à être employés.

L'étalement de la culture microbienne renfermant la dilution de bactériophage a été effectué par un seul passage de la baguette de verre à la surface de la gélose afin de tenir compte des observations de NICOLLE (*loc. cit.*) (tableau XII, p. 106).

Ce tableau montre que les chiffres obtenus par la technique de GRATIA, déjà très supérieurs à ceux donnés par celle de d'HÉRELLE, sont plus de deux fois plus forts que ceux fournis par les dilutions.

Ils illustrent la discussion que nous avons faite sur chacune des méthodes de numération des bactériophages et mettent en relief la valeur de celle de GRATIA.

VII. — *Conclusions.*

Dans cette seconde partie, nous avons passé en revue et discuté les différentes méthodes qui ont été proposées pour la numération des bactériophages par formation de plages sur gélose; nous nous sommes attachés surtout à celle de d'HÉRELLE.

Nos expériences ont porté sur une autre technique, celle de GRATIA, qui nous a paru présenter le plus de précision. Elle consiste à étaler sur la gélose d'une boîte de PETRI, afin d'obtenir des plages, non plus, comme le fait d'HÉRELLE, une très petite quantité de culture microbienne contenant le bactériophage très dilué, mais à étaler un volume plus important d'un bouillon faiblement gélosé contenant la culture microbienne et le liquide lytique dilué.

TABLEAU XII

Titrages d'une suspension de bactériophage (B. coli) aux dépens de la souche microbienne coli "urinaire"

TECHNIQUE DE GRATIA	COMPOSITION du mélange	NOMBRE de plages	MOYENNE	TITRE calculé
	1 cc ³ B ₈ ⁽¹⁾	85	93.75	468 × 10 ⁶ par cc ³
	2 cc ³ cult. microbes à	87		
	3 × 10 ⁹	108		
	2 cc ³ gélose à 1.25 %	95		
TECHNIQUE DE D'HÉRELLE	QUANTITÉ de bactériophage étalée	NOMBRE de plages	MOYENNE	TITRE calculé
	0 cc 05 de B ₈	46	46	320 × 10 ⁶ par cc ³
	id.	24		
	id.	11		
	id.	13		
TECHNIQUE DES DILUTIONS	DERNIÈRE dilution active	B ₈ divisé en 10 tubes nombre de tubes limpides	MOYENNE	TITRE calculé
	B ₈	1	2	200 × 10 ⁶ par cc ³
	B ₈	3		
	B ₈	2		
	B ₈	2		

(1) Nous rappelons que nous désignons par B₁ la 1^{re} dilution au dixième soit 1/10^e. B₂ correspond à 1/10², etc...

Nous avons fait de cette méthode, une étude qui nous a amené aux conclusions suivantes :

1°) Une légère modification de la technique initiale de GRATIA permet un étalement plus aisé et sans grumeaux.

2°) Le nombre des microbes aux dépens desquels se forment les plages a une influence sur leur dimension qui est d'autant plus petite qu'ils sont plus nombreux. Si le nombre des microbes est compris entre $0,7 \times 10^8$ et $1,4 \times 10^9$ par c.c.³ du mélange à étaler, le nombre de plages formées par une même quantité du liquide bactériophage dilué, est sensiblement le même.

3°) La présence de microbes morts dans la culture diminue le nombre des plages formées, d'autant plus qu'ils sont plus nombreux.

4°) En opérant sur un bactériophage dilué de telle sorte qu'il y ait un maximum de 600 plages sur une boîte de PETRI de 100 mm. de diamètre, il y a proportionnalité entre le nombre de plages et la concentration du principe lytique.

5°) Nos expériences nous ont permis de constater que les chiffres obtenus varient suivant la souche microbienne employée ; on ne peut donc parler d'un nombre absolu de corpuscules mais seulement d'un nombre relatif à un microbe donné.

6°) La méthode de GRATIA, comme les deux autres, ne permet le titrage des bactériophages que s'ils ont une virulence suffisante pour produire des plages de dimension suffisante.

7°) Nous avons comparé les chiffres obtenus par titrage d'une même suspension de bactériophages en utilisant un même microbe, au moyen des 3 méthodes : dilution, d'HÉRELLE, GRATIA. Les résultats sont très nettement supérieurs avec la dernière d'entre elles.

CHAPITRE IV

PRODUCTION DE BACTÉRIOPHAGE ANTICOLI A PARTIR DES SOUCHES MICROBIENNES ELLES-MÊMES

Dans l'un des chapitres précédents, nous avons exposé comment on peut extraire les bactériophages anticoli des milieux naturels où ils se trouvent.

Plusieurs auteurs ayant publié des travaux d'après lesquels il est parfois possible de mettre en liberté des principes lytiques lorsqu'on traite de diverses façons des souches microbiennes normales, nous avons cru utile de reprendre leurs expériences en envisageant plus spécialement l'application possible à la préparation des principes lytiques anticoli.

Si une technique commode permettait d'extraire à coup sûr du bactériophage à partir de telles souches microbiennes, cela présenterait aussi un autre intérêt : On pourrait peut-être dans ce cas envisager son application aux espèces microbiennes pour lesquelles on n'a pu jusqu'ici isoler aucun bactériophage, et arriver à obtenir ainsi leur principe lytique spécifique.

Nous aurions pu ajouter cette étude à la suite du chapitre relatif à l'extraction du bactériophage anticoli des milieux naturels, mais en raison des développements que nous avons été amenés à lui donner, nous avons préféré la présenter à part.

Ainsi que nous l'avons fait jusqu'ici, nous avons divisé notre sujet en deux parties : 1°) travaux antérieurs ; 2°) travaux personnels, que nous allons successivement aborder.

A. — TRAVAUX ANTÉRIEURS

a) SOUCHES LYSOGÈNES

Il est bien admis actuellement que certaines souches dites « lysogènes » sont porteuses de bactériophage qui se reproduit en

même temps que la bactérie sans toutefois exercer sur elle d'effet lytique notable (1).

Différents travaux ont montré que de telles souches sont constituées par une union en équilibre de bactéries et de bactériophages ; c'est ce que d'HERELLE appelle « cultures mixtes ». Ces souches se rencontrent parfois dans les milieux naturels et pathologiques et elles résultent sans doute de l'action d'un bactériophage exogène sur le microbe.

On peut aussi les préparer artificiellement. Voici comment opèrent BORDET et CIUCA (166). On ensemence un *B. coli* normal sur la surface entière d'un tube de gélose que l'on maintient à l'étuve quelques heures jusqu'à l'apparition d'une très fine couche microbienne. On dépose alors sur le milieu de la surface une gouttelette de bactériophage. Celle-ci descend sur cette surface en y laissant une légère traînée. On reporte alors à l'étuve. Le lendemain, on trouve que la trace de la gouttelette apparaît en clair ; à ce niveau, il n'y a pas de couche microbienne, la gélose garde sa transparence. Plus tard, des colonies isolées apparaissent sur cette zone ; leurs contours sont irréguliers et déchiquetés (1). Repiquées sur gélose, ces colonies donnent bientôt une culture glaireuse qui véhicule le pouvoir lytique.

Il est généralement aisé de libérer le bactériophage de ces souches lysogènes ; il suffit de filtrer des cultures en bouillon pour obtenir un liquide actif sur une culture microbienne sensible de la même espèce microbienne.

GILDEMEISTER et HERZBERG (167) ont étudié en détail les conditions de libération de bactériophage à partir d'une souche de *coli* lysogène nommée « 88 ». Ils ont établi que la température d'incubation de la culture doit être supérieure à $+9^{\circ}$; par contre, le milieu de culture importe peu. Plus récemment, PROCA (168) a extrait le bactériophage d'une souche lysogène en la traitant par le sublimé au 1/1000. Ce produit tue les germes tout en respectant le principe lytique.

Certaines souches lysogènes contiennent un bactériophage

(1) Il y a là un point délicat sur lequel on n'est pas fixé. Le bactériophage des cultures lysogènes se reproduit-il en lysant des bactéries ? Mais comment le ferait-il, puisque celles-ci sont résistantes ? Il faudrait admettre que certaines cellules sont tout de même sensibles ou que le bactériophage se reproduit sans le concours du microbe ou encore que la résistance est due à la membrane, celle-ci n'intervenant plus lorsque le bactériophage est intra-cellulaire.

(1) Nous attirons dès maintenant l'attention du lecteur sur l'aspect de ces colonies. Nous développerons plus loin cette question et nous verrons que ces colonies correspondent aux formes « rugueuses » décrites primitivement par Arkwright.

suffisamment actif pour ne pas passer inaperçu. Il n'en est pas toujours ainsi et il existe des souches dont les filtrats de culture ne révèlent une action lytique qu'à condition de leur fournir une souche microbienne très sensible sur laquelle elles puissent se manifester. C'est probablement en utilisant une telle souche détectrice ultrasensible que KLINE (169) a pu obtenir 11 fois un bactériophage homologue à partir de 21 souches microbiennes. Les souches utilisées étaient surtout des *B. dysentériques*, mais l'expérience a été réussie également avec le *B. coli*.

BURNET (170) a montré l'importance de la souche détectrice si l'on veut mettre en évidence le bactériophage contenu dans certaines souches de microbe. Ses études ont porté sur les *Salmonella* et cet expérimentateur a pu montrer que certaines souches de *Salmonella gallinarum* sont particulièrement sensibles aux bactériophages contenus dans d'autres espèces de *Salmonella* (').

b) SOUCHES APPAREMMENT NON LYSOGÈNES

L'obtention de bactériophage à partir de microbes normaux, apparemment (') exempts de ce principe, a donné lieu à de nombreux travaux. Plusieurs auteurs, par des techniques que nous allons passer en revue, ont réussi à libérer du principe lytique et en ont tiré argument en faveur de leur conception sur son origine.

Si le bactériophage est, comme le dit d'HÉRELLE, un parasite indépendant, il ne doit pas être possible de le former à partir d'un microbe qui en est exempt. Si, au contraire, par un traitement approprié du microbe ultrapur (2) on arrive à libérer un bactériophage, c'est que ce dernier est un produit du microbe : une diastase autolytique par exemple.

On conçoit l'importance du problème. Malgré les travaux dont il a été l'objet il n'est pas résolu car il n'est pas possible actuellement d'affirmer qu'une souche microbienne est ultrapure ou ne l'est pas, et c'est ce fait qui conditionne la conclusion que l'on peut tirer de toutes ces expériences.

D'HÉRELLE, dans un livre, « Le Bactériophage et son comportement », parlant des souches ultrapures, dit exactement ceci :

Le bactériophage existe partout dans la nature ; il n'est donc

(1) SMITH et JORDAN (171) ont trouvé de façon semblable qu'un grand nombre de souches diphtériques sont lysogènes vis-à-vis d'une souche sensible de même espèce.

(1) Nous employons à dessein ce terme de apparemment car, ainsi que l'a montré Lominski, certaines souches peuvent contenir du bactériophage qui ne se libère que par des artifices spéciaux.

(2) Ultrapur (suivant d'Hérelle) signifie exempt de bactériophage.

pas étonnant que les bactéries subissent son action et que de nombreuses cultures mixtes existent dans les collections conservées au laboratoire.

Si nous repiquons sur gélose une culture mixte artificielle, « nous savons » que certaines colonies sont ultrapures et que d'autres, plus ou moins nombreuses, sont contaminées par le bactériophage.

D'HÉRELLE ne donne pas la preuve de cette affirmation ; d'ailleurs, à une autre place de son livre, il reconnaît qu'il est très difficile de vérifier si une souche est ultrapure.

Pour notre part, sans nier l'ultrapureté peut-être possible de certaines souches, nous pensons que l'absence de bactériophage dans les filtrats de culture n'est pas une preuve suffisante pour affirmer que le microbe expérimenté est rigoureusement exempt du principe lytique. Non seulement un tel principe peut passer inaperçu s'il est très faible ou si l'on ne possède pas le détecteur convenable, mais en outre on peut concevoir qu'il soit fixé de façon suffisamment solide sur le microbe pour ne pas s'en détacher et manifester son action.

Nous avons vu que lorsqu'on cultive sur bouillon des souches lysogènes, celles-ci abandonnent au milieu de culture des bactériophages actifs sur certaines autres souches. LOMINSKI (172) a montré que lorsqu'on repique fréquemment en bouillon, toutes les huit heures par exemple, de telles souches lysogènes, le bactériophage qu'elles portent s'atténue peu à peu au point de vue de son action lytique. Le pouvoir de fixation est par contre conservé et il peut se manifester en rendant résistant une culture de la bactérie sensible ayant servi à préparer artificiellement la souche lysogène. Si l'on poursuit les repiquages fréquents, on obtient au bout d'un temps variable avec l'espèce et le milieu, des cultures dont les filtrats sont complètement alytiques et ont perdu la faculté de rendre résistants les microbes sensibles. Les souches ainsi obtenues sont qualifiées par LOMINSKI de cryptolysogènes. Ce sont pourtant des souches contenant du bactériophage. Celui-ci ne se manifeste apparemment pas mais certaines conditions de culture sont capables de le mettre en évidence. LOMINSKI a pu réactiver ces bactériophages en cultivant les souches cryptolysogènes dans des conditions dysgoniques : milieu solide pauvre, pH, température.

En raison de la diffusion du bactériophage anticoli dans la nature, il est infiniment probable que les souches de coli de collection des laboratoires ont toutes subi l'action du principe lytique avant leur isolement. Il est possible qu'ensuite des cultu-

res mixtes se soient constituées, puis que se soit réalisée in vivo la transformation en souche cryptolysogène de LOMINSKI.

Il est possible que les techniques diverses employées par les auteurs pour provoquer la « genèse du bactériophage » ne soient en réalité que des expériences de réactivation ayant placé le bactériophage dans des conditions plus favorables pour lui.

Nous allons, dans les pages qui suivent, exposer ces techniques ; nous aurions pu tenter de les classer suivant l'hypothèse invoquée à la suite de certaines d'entr'elles par leurs auteurs pour expliquer la libération du principe lytique mais, toute interprétation à ce sujet manquant dans certains mémoires, nous avons préféré les grouper suivant les méthodes employées.

I. — *Production de bactériophages par action de leucocytes sur les microbes.*

BORDET et CIUCA (173) prélèvent l'exsudat péritonéal très riche en leucocytes d'un cobaye qui a reçu à quelques jours d'intervalle 3 ou 4 injections intrapéritonéales de *B. coli*. Ils constatent qu'une petite quantité de cet exsudat clarifie une culture normale du même coli en bouillon ; la culture lysée peut produire le même effet sur une nouvelle culture normale du même microbe et ceci indéfiniment.

Cette expérience est répétée par BAIL (174) qui n'obtient pas d'une première expérience les résultats observés par BORDET et CIUCA. Par la suite, en expérimentant sur une souche de Flexner et une souche de Coli et en inoculant une dose capable de provoquer la mort de l'animal, il réussit à obtenir les bactériophages actifs sur les deux souches utilisées.

Plus tard, BLAIR (175) cherchant à préparer des bactériophages antidiphthériques, opère suivant la technique de BORDET et obtient ainsi des bactériophages actifs sur certaines souches de *B. diphthérique*. Toutefois, les résultats ne sont pas réguliers.

Faut-il conclure que dans ces expériences le bactériophage s'est produit à partir du microbe injecté ? La preuve n'en est pas faite. De nombreux expérimentateurs ont pu montrer depuis que le bactériophage existe ou peu exister dans les humeurs de l'organisme, le liquide céphalo-rachidien et dans les organes (rate, foie). Il est donc possible que les bactériophages mis en évidence par les auteurs cités proviennent de l'animal inoculé.

C'est sans doute pour répondre à cette objection que LISBONNE et CARRÈRE (176) ont fait agir in vitro des exsudats leucocytaires sur des bacilles de Shiga. Ces exsudats résultent de l'injection de divers produits (essence de térébenthine, « Millins food ») dans

le péritoine de cobayes ou sous la peau du thorax ou du ventre de deux chiens.

Si, à 10 c.c.³ de bouillon, on ajoute 30 à 60 gouttes de pus ainsi obtenu et quelques gouttes de culture de *B. Shiga*, on constate qu'après une incubation de 5 jours à 37°, le mélange filtré sur bougie donne un liquide doué d'un pouvoir lytique qui devient très actif après 3 ou 4 passages.

Pour cet auteur il est difficile d'admettre que les leucocytes sont parasités par du bactériophage. D'HÉRELLE, au contraire, pense que le bactériophage étant normalement phagocyté comme l'ont montré BRUYNOCHE et MAISIN, il est normal de le rencontrer dans les exsudats leucocytaires.

La question en est là. Nous décrirons plus loin les expériences que nous avons faites à ce sujet.

II. — *Antagonisme microbien.*

A la suite de leurs expériences déjà décrites sur l'action des leucocytes sur les microbes *in vitro*, LISBONNE et CARRÈRE ont mis au point trois techniques d'égale valeur leur permettant d'obtenir la lyse transmissible des *B. Shiga*, mais, cette fois, en mettant en jeu l'antagonisme microbien.

Les modes opératoires sont les suivants :

1°) Une culture de *B. Shiga* en bouillon est conservée 6 jours à l'étuve. Au bout de ce temps, on ajoute une trace de *B. coli* et on reporte à l'étuve durant 48 heures, puis on filtre sur bougie. Ce filtrat est inoculé à des nouvelles cultures et au bout de deux, trois ou quatre passages, il provoque la lyse du bacille de Shiga.

2°) 10 c.c.³ de bouillon reçoivent une forte émulsion de culture de bacille de Shiga et une trace de *B. coli*. Après 48 heures on filtre, comme dans la méthode précédente. Ce filtrat ajouté à de nouvelles cultures provoque la lyse après quelques passages.

3°) On ensemence 10 c.c.³ de bouillon avec du bacille de Shiga. Le lendemain on ajoute du coli puis, quotidiennement pendant 4 jours, une émulsion de bacilles de Shiga de 24 heures ; on filtre sur bougie. On constate que le filtrat manifeste des propriétés lytiques anti-dysentériques après quelques passages.

Par quel mécanisme ces propriétés lytiques se font-elles jour ? Les auteurs, sans discuter le détail de leurs techniques, admettent simplement que la lyse transmissible est la résultante de la viciation du métabolisme de l'un des microbes (*Shiga*) par la présence de l'autre (*coli*).

Nous dirons plus loin ce que nous pensons de cette interprétation.

III. — *Bactériophagie déclanchée par un activateur.*

Plusieurs auteurs considèrent la bactériophagie comme un phénomène d'autocatalyse. On peut d'après eux concevoir que la lyse résulte de l'action d'un ferment se trouvant à l'intérieur du microbe sous une forme inerte, mais susceptible d'être activé par différentes interventions.

Le phénomène une fois déclenché, régénérerait du ferment par autocatalyse.

Nous avons déjà exposé les bases de cette conception au cours de l'introduction et cité l'exemple de la formation de la thrombine. Voici d'autres exemples :

La pepsine, la trypsine se forment à partir de leurs précurseurs inactifs par une réaction d'autocatalyse ; la chymotrypsine (diastase pancréatique qui caille le lait) est formée par action de la trypsine sur un précurseur inactif. JERMOLJEWA, BUJANOWSKAJA et SEVERIN (177) donnent en outre la comparaison suivante :

Si l'on mélange de l'acétate d'éthyle et de l'eau, l'ester a tendance à s'hydrolyser et à former de l'acide acétique et de l'alcool. La réaction est très lente ; mais, si l'on ajoute une petite quantité d'acide acétique, elle est considérablement accélérée et le mélange réactionnel s'enrichit en acide acétique. Si l'on transporte maintenant une petite quantité de ce liquide partiellement hydrolysé dans un mélange neuf d'acétate d'éthyle et d'eau, il catalysera à son tour la réaction d'hydrolyse. On pourra ainsi transmettre le phénomène indéfiniment.

Dans le but de vérifier l'hypothèse suivant laquelle la lyse transmissible serait un phénomène d'autocatalyse, JERMOLJEWA et ses collaborateurs relatent des expériences dans lesquelles ils arrivent à mettre en évidence des bactériophages par action de bile diluée sur des cultures de coli et de dysentérique (Flexner) tuées par le thymol ou par la chaleur dans un milieu saccharosé.

D'après la conception exposée plus haut, la bile activerait le précurseur et le transformerait en ferment capable d'agir à son tour sur une nouvelle quantité de précurseur, etc...

Les auteurs ne précisent malheureusement pas s'ils ont recherché la présence de principe lytique dans la bile employée. Nous pensons pourtant que c'est ce point qui conditionne toute la valeur de l'expérience.

Dans une autre série d'essais, les mêmes expérimentateurs envisagent l'intervention possible de l'oxydation pour déclencher la production de bactériophage à partir d'un proferment inactif contenu dans leurs souches microbiennes normales de coli et de

dysentérique. Ils disent être parvenus à un résultat en utilisant l'action oxydante de l'eau oxygénée additionnée de peroxydase. Il n'y a malheureusement dans leur mémoire aucun détail sur la technique employée.

Deux autres auteurs, LE MAR et MYERS (178) ont entrepris, eux aussi, l'oxydation des cultures microbiennes ; ils sont parvenus à libérer du bactériophage par ce moyen. Ces auteurs ne précisent pas la conception exacte qu'ils se font du mode d'action des phénomènes d'oxydation ; ils se contentent de citer les faits suivants qui les ont incité à chercher dans ce sens : D'HÉRELLE (61), BRONFENBRENNER (179), EATON (180) avaient remarqué que le bactériophage suffisamment dilué stimule le métabolisme bactérien ; ils avaient vu aussi que la consommation d'oxygène augmente beaucoup au cours de la bactériophagie et durant quelques heures après la cessation de la lyse. Enfin, plusieurs auteurs avaient montré que la lyse est accélérée lorsqu'on expose la culture librement à l'air.

LE MAR et MYERS font pousser divers microbes Typhi, coli, staphy, dans du bouillon peptoné ou dans du bouillon au sang ; ils stérilisent ensuite les souches en les mettant à l'autoclave pendant 20 minutes, à une pression de 15 livres par pouce carré. Puis ils les portent de nouveau 48 heures à l'étuve à une température de 37°. Ils ajoutent 10 c.c.³ d'eau oxygénée à 3 % par 100 c.c.³ de culture et portent encore une fois à l'étuve pendant 48 heures à 37°. Les extraits de chacun de ces liquides d'oxydation, obtenus avec de l'éther, contiennent des agents lytiques spécifiques du microbe employé. L'action se transmet en série sans diminution d'activité. Un chauffage à 75° de 30 minutes l'inhibe ; enfin, la lyse se manifeste sur gélose par des plages circulaires. Ces propriétés sont bien celles du bactériophage ; pourtant, la solubilité du principe actif dans l'éther est surprenante.

Dans leur mémoire, ces auteurs n'ont pas précisé comment ils conçoivent le rôle de l'oxygène mais GOLDI (181), dans un long travail, donne l'explication suivante :

Il suppose que la bactériophagie qu'il nomme « autolyse transmissible » se forme par le concours d'un catalyseur d'oxydation, capable d'effectuer une activation des processus d'oxydation dans la cellule bactérienne. Cette cellule libérerait ensuite du catalyseur qui agirait à son tour sur d'autres, etc... Cette action oxydative dénaturerait les bactéries qui deviendraient alors plus sensibles à l'action de leurs propres ferments autolytiques ou à celle des ferments autolytiques d'autres bactéries.

IV. — *Production de Bactériophage par culture de microbes en milieu alcalinisé.*

Dans un article intitulé : Sur la nature de la lyse transmissible, PLANTUREUX (182) relate des expériences démontrant qu'il est possible par culture de bacille de Shiga en bouillon très alcalinisé, puis repiquage sur gélose, de faire apparaître des colonies lysogènes. L'auteur a préalablement éprouvé ses souches afin de vérifier qu'elles étaient indemnes du principe lytique. Pour cela, des cultures de 15 et 30 jours en bouillon ordinaire (pH 7,8) ont été filtrées sur bougie Chamberland. Le filtrat a été ajouté en quantité variable à des tubes de bouillon préalablementensemencés avec une goutte de culture jeune de B. Shiga. Aucune lyse n'a pu être constatée, et par étalement sur gélose, aucune plaque ne s'est formée.

L'auteur ne s'est pas contenté de ce test ; il a utilisé pour débarrasser ses souches de tout bactériophage éventuel, l'un des procédés connus qui consiste à faire des passages en bouillon à la limite de l'acidité tolérée. Il en a fait 10. Les souches ainsi préparées sont ensemencées en bouillon (5 c.c.) et on ajoute respectivement 1-2-3-4-5-6 gouttes de soude normale par tube. On laisse incuber à 37° et on repique sur gélose chaque semaine. Les tubes ayant reçu 4, 5 et 6 gouttes présentent dès le premier repiquage des colonies anormales d'aspect givré, bord dentelé (1).

La culture est agglutinée et le filtrat provoque la lyse d'une culture jeune non traitée. La lyse est transmissible et présente tous les caractères de la bactériophagie. Mentionnons que l'auteur n'a obtenu ce résultat aussi facilement qu'avec le bacille dysentérique ; il signale qu'avec une souche de bacille de la typhose aviaire et avec une souche de paratyphique B, il a dû faire une série de passages pour obtenir une action lytique.

L'auteur ne donne aucune interprétation de son observation ; il considère seulement que l'apparition du bactériophage dans des souches bactériennes pures, est incompatible avec l'hypothèse du virus vivant de d'HÉRELLE.

V. — *Production de bactériophage par culture sur milieux additionnés de chlorure de calcium.*

Le même auteur (183), devant les résultats obtenus par culture en milieux alcalinisés, a cherché si d'autres changements des conditions de vie du microbe ne peuvent aboutir à la production

(1) Nous attirons l'attention du lecteur sur ce point ; nous y reviendrons plus loin.

de principes lytiques. Il a repris une idée de BÉGUET (185) d'après laquelle le bactériophage serait constitué par des « colloïdes microbiens modifiés ». Pour ce dernier auteur la « modification » résulterait d'un abaissement de la pression osmotique des colloïdes. PLANTUREUX a pensé qu'il s'agit plutôt d'un changement de signe électrique des colloïdes microbiens et il a basé cette opinion sur le fait que la réaction bactérié-bactériophage serait conditionnée par l'accolement de deux colloïdes de charge différente.

Ce changement de signe ou cette « modification » des colloïdes microbiens suivant les idées de BÉGUET, PLANTUREUX a cherché à l'obtenir en s'appuyant sur les travaux de BOUTARIC d'après lesquels il est possible d'agir sur la charge d'un colloïde au moyen de solutions d'électrolytes contenant des cathions polyvalents : Ca^{++} , Ba^{++} , Sr^{++} , Mg^{++} .

Nous ne nous étendrons pas davantage sur la théorie que soutient ce bactériologue ; nous ferons seulement remarquer que plusieurs publications ont montré l'importance des sels calciques dans le phénomène de la bactériophagie. Ainsi STAFANO et BEAUFORT (184), puis BORDET et RENAUX (247) ont montré que certains principes lytiques sont inactifs en l'absence d'ions calcium. Si cet élément est rajouté au milieu, l'activité reparaît.

Voici maintenant les expériences décrites par PLANTUREUX : A 5 tubes de bouillonensemencés avec petite quantité de bacille dysentérique de Shiga, Flexner ou Hiss, on ajoute respectivement 2, 4, 8, 15, 30 gouttes de solution de chlorure de calcium à 2 % ; on met à l'étuve à 37°, on repique tous les 7 jours sur gélose inclinée et on obtient généralement au premier passage, presque toujours au deuxième, des colonies lysogènes. Les solutions de chlorure de baryum et de strontium donnent des résultats identiques ; celles de sulfate de magnésium n'agissent qu'à des concentrations plus élevées. L'auteur ne dit pas si les résultats sont généralisables aux autres espèces microbiennes.

VI. — *Obtention de bactériophage par traitement des cultures avec du gel d'alumine.*

Nous avons vu au cours de l'Introduction que plusieurs auteurs (KABESHIMA, BORDET et CIUCA, GRATIA, LEGROUX) n'admettent pas la théorie de d'HÉRELLE sur « le bactériophage être vivant parasite des bactéries ». Pour eux, la lyse transmissible est due à une diastase produite par les microbes eux-mêmes. C'est également l'opinion de BERNARD et GUILLERM (186) qui montrent que des cultures de 24 ou 48 heures de vibrion cholérique contiennent du principe lytique mais que celui-ci est gêné dans son action par

une substance empêchante adsorbable par l'alumine. Cette interprétation est appuyée par les faits suivants : NORTHROP (187) a pu établir que l'activation de certaines prodiastases (chymotrypsinogène, trypsinogène) pouvait être gênée par de petites quantités d'impuretés. Il faut pour activer une solution de trypsinogène amorphe, de grandes quantités de trypsine ou des solutions concentrées de SO_4Mg . Par contre, après purification et obtention de trypsinogène cristallisé, il y a transformation très rapide en diastase active par simple dissolution dans des solutions neutres. Cette différence de comportement est due au fait que les préparations amorphes contiennent des traces d'une substance qui inhibe la trypsine et empêche la réaction autocatalytique de se produire. Dès que cette substance inhibante est éliminée par cristallisation, la moindre trace de trypsine déclenche la réaction d'activation. BERNARD et GUILLERM ont fait agir du gel d'alumine sur une culture pure de vibrions cholériques et sont arrivés de cette façon à en libérer une substance lytique capable d'agir sur des vibrions jeunes et qu'ils ont identifiée à du bactériophage. Cette substance lytique se trouve surtout dans le liquide clair centrifugé mais aussi, quoique en moins grande quantité, fixée à l'alumine d'où on peut l'enlever par élution.

Dans un second mémoire, les mêmes auteurs (188) ont donné les renseignements suivants sur leur technique :

Une culture pure de vibrions est retirée de l'étuve 48 heures après ensemencement. On centrifuge. Le bouillon est traité par du gel d'alumine (quantité et concentration non indiquées) et de nouveau centrifugé. On concentre le liquide clair et on le précipite par une solution saturée de sulfate d'ammonium. Le précipité obtenu contient du bactériophage anticholérique que l'on peut aisément mettre en évidence par les techniques habituelles.

VII. — *Bactériophage à partir des vieilles cultures microbiennes.*

Nous avons vu que certaines souches microbiennes, dites lyso-gènes, libèrent du bactériophage que l'on retrouve facilement dans les filtrats de leurs cultures jeunes en bouillon.

D'après OTTO, MUNTER et WINCKLER (189), certaines vieilles cultures en bouillon de bacilles des groupes coli, typhi, dysentériques (plus spécialement de ces deux derniers), contiennent du principe lytique alors que les cultures jeunes en sont dépourvues. Il semble dans ce cas que la présence de produits du métabolisme bactérien dans le milieu soit la cause de cette mise en liberté de bactériophage. Toujours d'après les mêmes auteurs, diverses

substances peuvent exercer une influence favorisante sur le phénomène ; ce sont l'addition au milieu, d'immun sérum, de bactériophage inactivé ou d'une solution faible de sublimé ⁽¹⁾.

Avant OTTO et ses collaborateurs, BAIL (190) avait réussi à obtenir des principes lytiques en introduisant à plusieurs reprises des cultures pures de bactéries normales dans du bouillon de viande, après avoir éliminé au moyen d'une centrifugation, les cellules microbiennes provenant de la culture précédente. Au bout d'un certain nombre d'opérations, un bactériophage actif apparaissait dans le bouillon.

L'auteur a toutefois souligné que cette méthode ne convient pas à toutes les souches et ceci spécialement dans le cas du coli.

On remarquera que cette technique, quoique un peu différente de la précédente, aboutit elle aussi en fin de compte à enrichir le milieu en produits de la vie des microbes.

FUKUDA (191) a décrit des expériences d'après lesquelles il est arrivé, par des « surpeuplements », à provoquer l'apparition de bactériophage dans des cultures microbiennes.

Cet expérimentateur fait d'abord remarquer que les souches sur lesquelles il a opéré, n'ont jamais manifesté de phénomènes lytiques durant une conservation de plusieurs années dans son laboratoire. Ce point précisé, voici le mode opératoire qu'il a employé :

Le premier jour, on ensemence plusieurs tubes contenant 5 c.c. de bouillon avec une anse de culture de *B. dysentérique*. On laisse incuber à 37°. Le deuxième jour, on centrifuge le contenu de ces tubes, on décante le liquide clair qui recouvre le culot microbien et on le remplace par 4 c.c. de bouillon stérile. On centrifuge de nouveau de façon à obtenir un liquide tout à fait clair au-dessus du sédiment.

On ensemence le bouillon bien limpide avec une anse de culture en bouillon et on laisse incuber 24 heures à 37°.

Pendant les jours suivants, on répète les centrifugations et les additions de bouillon. On examine chaque liquide de centrifugation et on constate après un certain nombre de ces traitements, l'apparition de bactériophage actif vis-à-vis d'une souche connue pour être particulièrement sensible.

Dans les expériences que nous venons de rapporter, les auteurs : OTTO et ses collaborateurs, BAIL, et FUKUDA ont opéré en milieu liquide. BÉGUER a publié en 1927 (185) un procédé très original qui lui a permis d'observer l'action des produits de métabolisme

(1) Nous verrons plus loin que ces mêmes substances possèdent le pouvoir de produire la transformation microbienne S—R.

ou d'autolyse dans la formation des bactériophages à partir des microbes, non plus en milieu liquide mais sur gélose. Voici le détail des expériences qu'il a décrites :

« On part d'une culture de microbes provenant d'une colonie
« isolée de bacilles dysentériques Shiga. Cette culture présente
« les caractères que d'HÉRELLE assigne aux colonies « ultrapures »,
« c'est-à-dire lysables et non lysogènes. On ensemence cette
« culture sur gélose ordinaire en dessinant un anneau épais avec
« un espace central libre d'un centimètre carré environ. Après
« 48 heures, on inocule l'espace central avec des microbes prove-
« nant d'une colonie semblable à celle qui a servi à constituer
« la première culture. Le développement sur ce milieu semi-
« vacciné est très grêle et le repiquage donne des colonies isolées
« très diverses, variant du type « limpide » et à peine visible, au
« type givré puis opaque. Les colonies du type « limpide » don-
« nent des cultures poussant très lentement et reviennent au type
« normal sur les milieux ordinaires. Les microbes du type le
« plus opaque donnent des cultures agglutinées en bouillon. Si
« on ajoute à une culture de 4 jours en bouillon d'une de ces
« colonies secondaires opaques, une anse de platine de microbes
« provenant de la culture de Shiga initiale et que l'on filtre après
« 24 heures, on obtient un liquide dans lequel on peut mettre
« en évidence les propriétés du bactériophage de d'HÉRELLE. »

L'auteur explique les faits observés par un abaissement de la pression osmotique des microbes qui ont vécu sur milieux hyperalcalinisés par l'ancienneté des cultures.

VIII. — *Expériences de Rosenthal.*

Pour terminer, mentionnons les expériences décrites par ROSENTHAL (192).

On prend une culture sur gélose de la bactérie à étudier et, partant d'une colonie à bords bien nets, on fait un certain nombre de repiquages et d'étalements afin de vérifier qu'il n'y a pas de manifestation lytique et que par conséquent la souche bactérienne utilisée ne contient pas de bactériophage.

On prépare des dispositifs constitués par une bougie de porcelaine L5 de petit calibre (75 mm. de long) fixée sur un tube de verre, par sa petite vernissée, au moyen d'un morceau de coton. Le tout est stérilisé au four à flamber.

On fait alors au moyen de la souche bactérienne une culture jeune en bouillon qu'on introduit à la fois dans la bougie et dans le tube de verre qui la supporte ; de cette façon, la bougie trempe longuement dans la culture microbienne.

Après 48 heures à 37°, on introduit dans la bougie d'un dispositif identique au précédent, une certaine quantité de liquide contenu dans le tube de verre de l'opération précédente. Cette seconde bougie trempe dans une culture jeune de la même bactérie. On la laisse incuber 48 heures à 37°. On répète cette opération tous les deux jours et on constate généralement qu'au bout d'un certain nombre de passages, variables avec l'expérience en cause, il se produit un éclaircissement marqué de la culture microbienne placée dans le tube de verre dans lequel plonge la bougie. Cet éclaircissement est dû à des bactériophages. Parfois la manifestation lytique est très fugace et la présence du bactériophage ne se manifeste que par des plages, très petites, sur gélose.

L'auteur a appliqué avec succès cette technique aux bacilles typhiques, paratyphiques, pyocyaniques et aux pneumocoques et gonocoques.

Sur l'explication des faits qu'il a observés, ROSENTHAL ne s'étend pas. Il pense toutefois que la lyse transmissible fait partie d'une phase constante de l'évolution vitale de la bactérie et que la technique qu'il indique permet de saisir un phénomène passé généralement inaperçu.

Deux expérimentateurs, M^{lle} LE SOUDIER et J. VERGE (193) ont cherché à vérifier la technique de ROSENTHAL mais n'ont pu en aucun cas obtenir les résultats annoncés par cet auteur.

★★

Nous allons maintenant exposer les essais auxquels nous nous sommes livrés afin de vérifier ou d'étendre aux bacilles coli, les expériences décrites ci-dessus.

B. — ESSAIS DE VÉRIFICATION OU D'EXTENSION DE CES TRAVAUX AUX BACILLES COLI. — DISCUSSION.

I. — *Recherche du caractère lysogène de nos souches.*

Avant d'entreprendre des expériences ayant pour but d'obtenir des bactériophages à partir de souches microbiennes, il importe de s'assurer qu'elles ne présentent pas le caractère lysogène.

On a vu que certaines souches possèdent la propriété d'entretenir des principes lytiques qui se reproduisent en même temps qu'elles. Ces derniers, bien qu'actifs sur d'autres souches de la même espèce, ne paraissent exercer aucune action sur celle qui les porte.

Pour vérifier si des microbes sont « lysogènes », on en fait une culture en bouillon ordinaire et on filtre sur bougie Chamberland L3. Le filtrat obtenu est ajouté à la dose de quelques gouttes à un tube de bouillon ordinaire préalablement ensemencé avec une culture jeune d'une souche homologue sensible. On laisse incuber 12 heures, de préférence à la température du laboratoire et on compare à un témoin n'ayant pas reçu de filtrat. On obtient souvent une lyse dès le premier contact ; parfois, quelques passages sont nécessaires.

Nous avons fait cette recherche sur toutes nos souches et nous avons constaté que deux d'entre elles : JEAN et 1109 donnent des filtrats de culture qui, après un passage pour la première et trois passages pour la seconde, ont manifesté des propriétés lytiques sur notre souche sensible « urinaire ».

Nous avons vu que la souche « Jean » n'est pas un « coli » mais un « aérogène » (suivant la classification de MALCOLM). Le caractère lysogène de cette souche ne s'est pas maintenu ; lorsque après un an de conservation dans notre laboratoire nous avons voulu le vérifier, il avait disparu et parallèlement, la souche qui était sensible au bactériophage anticoli était devenue résistante.

La même transformation s'est faite sur la souche de coli 1109 devenue elle aussi non lysogène et résistante, mais cette souche a acquis en outre, après 15 repiquages faits à un mois d'intervalle, la propriété de s'étaler sur les milieux de cultures solides à la façon du *Proteus* ; elle a ensuite conservé ce caractère.

Ayant précisé qu'en dehors de ces deux souches : Jean et 1109, aucune des autres ne présente le caractère lysogène, nous allons reprendre, sur quelques-unes de ces dernières, les expériences effectuées avant nous et ayant abouti à la formation de bactériophages.

II. — *Essais de production de bactériophage par action des leucocytes sur le bacille coli « in vitro ».*

Nous avons vu dans la première partie de ce chapitre que BORDET a pu mettre en évidence des bactériophages dans le pus obtenu à la suite d'une injection intrapéritonéale de bacilles coli au cobaye.

Cette expérience a été répétée avec des résultats irréguliers par d'autres auteurs, sur le même microbe et sur ceux appartenant à d'autres espèces.

Les bactériophages obtenus par ce moyen proviennent-ils bien de l'action des leucocytes sur les microbes injectés ? La preuve

n'en est pas faite car on sait que diverses humeurs des organismes animaux peuvent en renfermer à l'état normal. Pour cette raison, nous n'avons pas jugé utile de reprendre les expériences de BORDET.

Rappelons aussi, qu'au moyen d'expériences faites *in vitro*, LISBONNE et CARRÈRE sont parvenus à produire des bactériophages par action d'exsudats leucocytaires sur des bacilles de Shiga.

Le même problème se pose ici : les exsudats employés ont-ils réellement provoqué la formation de principe lytique par leur action sur les microbes ou bien, celui-ci se trouvait-il déjà à l'intérieur des leucocytes ? Cette dernière éventualité est fort vraisemblable puisqu'on sait que les bactériophages sont normalement phagocytables.

Il n'est pas aisé de trancher cette question ; il faudrait pour cela avoir des leucocytes certainement exempts de bactériophages ; or, il n'existe pas de moyen capable de détruire ces derniers sans tuer les cellules blanches et inhiber leurs ferments.

L'inverse cependant est possible : on peut tuer les leucocytes par un chauffage à 52° sans agir sur les bactériophages. Si, après un tel chauffage, on arrive à mettre en évidence du principe lytique dans une émulsion de globules blancs, c'est que ce principe préexistait ou qu'il s'est formé par action des ferments leucocytaires sur les microbes soumis à la lyse.

On peut aussi laisser les leucocytes s'autolyser, filtrer sur bougie pour séparer les restes de cellules et rechercher si le filtrat détermine la lyse d'une suspension microbienne. Si cette éventualité se produit, on peut conclure encore, soit que du bactériophage existait dans les leucocytes, soit que les ferments contenus dans ces derniers en ont produit par leur action sur les microbes.

Nous avons entrepris ces deux expériences, non dans le but d'apporter une solution définitive au problème mais pour en resserrer les limites si cela est possible.

Nous avons préparé une suspension de leucocytes en centrifugeant du sang de cheval recueilli aseptiquement et citraté.

Les globules blancs se trouvant à la surface du culot ont été prélevés, puis lavés avec du sérum physiologique et centrifugés ; ceci à trois reprises.

Nous avons recherché la présence éventuelle de bactériophages dans des liquides de lavage et nous n'en avons pas trouvé.

La moitié de notre émulsion de leucocytes (5 c.c.) a été chauffée à 52° pendant 1/2 heure, on l'a ensuite ajoutée à 10 c.c. de bouillon contenant environ 200.000.000 de coli sensible « urinaire » par c.c.³. Après incubation de 12 heures à 37°, le mélange

a été centrifugé, puis filtré sur bougie L3 et nous avons recherché si le filtrat contenait ou non du bactériophage. L'autre moitié de l'émulsion de leucocytes a été abandonnée dans un tube scellé, à l'étuve à 37°, pendant 4 jours, après avoir ajouté 1 gramme de toluène, puis traitée de la même façon que l'émulsion chauffée. Dans les deux cas il y a une légère inhibition de la croissance microbienne dans les tubes ayant reçu des produits leucocytaires. Cette inhibition ne s'est pas maintenue au cours de 6 passages réalisés par la suite.

Notre émulsion leucocytaire ayant subi aucun traitement n'a d'ailleurs pas davantage provoqué la lyse de notre coli sensible dans les conditions employées par LISBONNE et CARRÈRE.

Sans contester les résultats de LISBONNE et CARRÈRE obtenus au moyen du bacille de Shiga, nous pouvons conclure que dans le cas du coli, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence du bactériophage par action sur ce microbe, soit de leucocytes vivants de cheval, soit par action des mêmes leucocytes tués, soit enfin par action d'un autolysat de ces globules blancs.

III. — *Essais de productions de bactériophage anticoli par antagonisme microbien.*

Nous avons vu qu'au moyen de trois techniques, LISBONNE et CARRÈRE ont réussi, en cultivant du bacille de Shiga en présence de bacille coli, à mettre en évidence un principe lytique actif anti-Shiga.

Nous avons cherché ici à vérifier les observations de ces auteurs en opérant exactement suivant leurs indications.

Première Technique. — Nous avons ensemencé en bouillon ordinaire une souche de bacille de Shiga de la collection de l'Institut Pasteur et nous avons maintenu la culture obtenue pendant six jours à 37°. Nous avons ensuite ajouté une petite quantité d'une culture jeune de notre coli sensible « urinaire » puis reporté le tube à l'étuve pendant 48 heures. Nous avons ensuite filtré puis recherché le bactériophage dans le filtrat en utilisant la souche de Shiga qui nous avait servi jusque-là.

A cet effet, 2 tubes de bouillon ordinaire ont été inoculés avec 2 gouttes de culture de 12 heures du bacille dysentérique ; l'un des tubes a reçu en plus 10 gouttes du filtrat (tube B). Après incubation de 8 heures à la température du laboratoire, les deux tubes étaient également troubles. Le tube B a été filtré et ce nouveau filtrat éprouvé comme précédemment.

Nous avons effectué 8 passages dans ces conditions sans obser-

ver la moindre action lytique dans les tubes B. Aucune plage ne s'est non plus formée par étalement sur gélose, d'une trace de ces filtrats mélangée d'une petite quantité de culture jeune de Shiga additionnée d'une trace de ces filtrats.

Deuxième Technique. — Dans un tube contenant 10 c.c.³ de bouillon, nous avons émulsionné la nappe microbienne de 16 heures à 37° d'une culture de notre bacille de Shiga sur gélose inclinée. Nous avons ajouté ensuite une goutte de culture de 16 heures à 37° de notre coli « urinaire ». Après 48 heures d'étuve, nous avons filtré et essayé le filtrat, comme dans la première technique. Aucun résultat n'a été obtenu.

Troisième Technique. — 10 c.c.³ de bouillon ont étéensemencés avec une goutte de culture en bouillon de bacilles de Shiga ; le lendemain, nous avons ajouté une goutte de culture en bouillon du coli sensible « urinaire », puis chaque jour, pendant 4 jours, 5 gouttes de culture de 24 heures du bacille dysentérique. Au bout de ce temps, le contenu du tube a été filtré et le filtrat essayé sur une culture jeune de Shiga, toujours dans les mêmes conditions que celles indiquées plus haut. Là encore, le résultat a été entièrement négatif.

Une série d'expériences identiques a été faite, sans plus de succès, en utilisant cette fois, comme souche de coli, non plus la souche sensible « urinaire » mais la souche résistante « Phéné ».

Comment interpréter ces échecs : Nous croyons qu'ils tiennent aux souches utilisées et nous nous demandons si LISBONNE et CARRÈRE n'ont pas observé là un fait dû à une qualité particulière de l'une des 2 souches (Shiga et coli) qu'ils ont utilisée. Peut-être leur souche de coli était-elle contaminée par un bactériophage anti-coli ayant, ce qui arrive, une valence anti-Shiga.

Ces deux auteurs indiquent d'ailleurs dans leur mémoire qu'ils ont entrepris des recherches pour appliquer leur procédé au bacille typhique, au vibrion cholérique et au staphylocoque. Nous n'avons pas eu connaissance de la publication des résultats de ces essais.

Nous pouvons donc conclure que si la culture simultanée de germes d'espèces différentes (coli et Shiga) a pu provoquer la formation de bactériophages actifs pour l'un d'eux (expériences de LISBONNE et CARRÈRE), le fait ne paraît pas être général.

IV. — *Essais de production de bactériophage par action d'un « activateur » sur le bacille coli.*

Nous avons exposé la conception de JERMOLJEWA et ses collaborateurs d'après laquelle le bactériophage existerait dans tout

corps microbien à l'état de proferment susceptible d'être activé par différentes influences. Le ferment, une fois formé, se comporterait à son tour comme un activateur et permettrait au phénomène de se transmettre indéfiniment.

JERMOLJEW a d'abord utilisé la bile comme activateur et il est parvenu au moyen de ce produit, à provoquer la formation de bactériophage à partir de souches microbiennes normales.

Cette expérience ne peut avoir de valeur que si la bile ne contient pas de principe lytique. Nous avons fait cette recherche : pour cela, nous nous sommes procurés des vésicules biliaires de bœuf que nous avons ponctionnées aseptiquement, peu de temps après l'abattage. Nous avons constaté que quelques gouttes de cette bile provoquent la bactériophagie d'une culture faible de notre coli sensible « urinaire ». Doit-on conclure comme les auteurs cités que cette bile a agi en activant un précurseur contenu dans les cellules de coli ou ne doit-on pas plutôt penser que du bactériophage se trouvait à l'état libre dans la bile employée ? Si l'on admettait la première conclusion, on pourrait dire aussi que toutes les sources de bactériophage : eaux d'égouts, matières fécales, etc..., sont des activateurs ou contiennent des activateurs du précurseur lytique. Cette façon de voir nous paraît difficile à admettre, d'autant plus que nous avons vérifié que la même bile, stérilisée par chauffage à 100°, ne manifeste plus aucune action.

D'après les mêmes auteurs, l'oxydation serait-elle aussi capable, par un mécanisme du même ordre, de déclencher la production de bactériophage dans des corps microbiens provenant de souches normales de bacilles coli et dysentériques tués par la chaleur ? Elle agirait comme la bile en activant un proferment intracellulaire.

Aucun détail de technique n'étant donné, il ne peut être question de reproduire exactement les expériences de ces savants. Le mémoire indique seulement que l'oxydation a été effectuée par l'eau oxygénée additionnée de peroxydase.

Nous basant sur cette donnée, nous avons effectué l'expérience suivante :

Trois de nos souches : Val 1, Laffly, Urinaire, ont été soumises à l'action de l'eau oxygénée et d'une peroxydase très active contenue dans une gomme acacia que nous avons sélectionnée spécialement à cet effet.

Nous avons déterminé préalablement quelle concentration d'eau oxygénée il est possible d'employer sans détruire ni affaiblir de façon notable le bactériophage.

Les essais auxquels nous nous sommes livrés nous ont montré

que l'addition de 3 gouttes normales d'eau oxygénée à 3 % n'exerce aucune action nuisible sur 10 c.c.³ d'une suspension de bactériophages anti-coli, au titre de 50.000 corpuscules par c.c.³ et ceci durant un séjour de 12 heures à 37°. Des concentrations plus importantes en eau oxygénée produisent la destruction d'une partie des corpuscules.

Après cette expérience préliminaire, des cultures de 24 heures de nos 3 souches ont été additionnées de saccharose (1) à la dose de 10 % puis tuées par chauffage de 30 minutes à 70°. On a alors ajouté 3 gouttes d'eau oxygénée à 3 % pour 10 c.c. de culture et 1 goutte de préparation de peroxydase capable de produire en une minute, une coloration rouge très intense avec de l'eau saturée de gaïacol. Après 12 heures d'étuve, le mélange a été filtré sur bougie et le bactériophage recherché dans le filtrat. Le résultat a été négatif dans les 3 expériences que nous avons faites et ceci malgré 10 passages.

EXPÉRIENCES DE LE MAR ET MYERS

Ces expérimentateurs seraient, eux aussi, parvenus à produire du bactériophage par oxydation de souches microbiennes normales tuées par la chaleur.

Alors que JERMOLJEW et ses collaborateurs avaient stérilisé leurs bactéries par la chaleur en milieu saccharosé, sans doute pour protéger le proferment dont ils supposent la présence dans les corps microbiens, LE MAR et MYERS ont jugé cette précaution inutile et ont tué leurs germes microbiens à l'autoclave. Le bactériophage, une fois formé par oxydation au moyen de l'eau oxygénée, a été extrait à l'éther.

Nous nous sommes proposé de vérifier les expériences de ces deux derniers auteurs ; mais avant tout, il s'agissait de savoir si les bactériophages sont, ou non, extractibles à l'éther.

C'est KABESHIMA (195) qui, le premier, a effectué des essais dans ce sens ; il a constaté que non seulement l'éther mais aussi le chloroforme peuvent extraire les principes lytiques d'un liquide qui les contient,

D'HÉRELE, DE POORTER et MAISIN (194) ont contesté ce résultat qu'ils attribuent à un entraînement de fines gouttelettes de bouillon contenant le bactériophage.

(1) Dans leur travail relatif à l'action de la bile sur les corps microbiens, les auteurs ont tué les germes de leur culture, soit par le thymol, soit par la chaleur en milieu saccharosé. La présence du sucre a peut-être pour but de protéger le proferment auquel les auteurs font allusion dans leur mémoire.

LE MAR et MYERS (178) ont repris le problème en utilisant un bactériophage actif contre *Salmonella enteridis*. Ils ont pris soin de dessécher leurs extraits éthérés sur du chlorure de calcium anhydre et ont pu obtenir l'extraction de bactériophages un peu affaiblis mais présents tout de même.

Devant ces résultats contradictoires, VoËR (196) a apporté une nouvelle étude : il a agité du bactériophage anti-coli avec de l'éther dans une ampoule à décanter ; la couche éthérée a été séparée, séchée sur sulfate de soude anhydre, puis le solvant a été évaporé à basse température. L'auteur n'a pu extraire qu'une quantité insignifiante de principe lytique et pense qu'elle provient de la trace d'humidité entraînée malgré le séchage.

Nous avons repris cette question et agité longuement 25 c.c.³ du filtrat bactériophage anti-coli (B. Pb) avec 25 c.c.³ d'éther. La couche éthérée a été filtrée sur filtre mouillé à l'éther puis recueillie dans un tube à essais stérile contenant du sulfate de soude desséché. Après une longue agitation et une nouvelle filtration, l'éther a été évaporé dans le vide à la température ordinaire. Aucun résidu visible n'a pu être observé dans le tube après départ du solvant.

Dans le but de recueillir les bactériophages pouvant se trouver au fond du tube, nous avons rincé celui-ci avec 2 c.c.³ de bouillon ordinaire. Aucun effet lytique n'a pu être observé par action de ce liquide sur nos souches sensibles de *B. coli*.

Il restait donc à vérifier la deuxième partie des expériences de LE MAR et MYERS, c'est-à-dire la mise en liberté du bactériophage par action de l'eau oxygénée sur les microbes. C'est ce que nous avons entrepris.

Nous avons opéré sur 3 de nos souches de coli : Urinaire, Laffly et Val 1, en suivant exactement les indications des auteurs. Des cultures de 24 heures dans 10 c.c.³ de bouillon ordinaire, de chacune de ces souches, ont été autoclavées 20 minutes à une pression de 1 kilo. Après incubation de 48 heures à l'étuve, nous avons ajouté 1 c.c.³ d'eau oxygénée à 3 % à chacun des tubes. Après une nouvelle incubation de 48 heures à l'étuve, nous avons filtré et recherché le bactériophage par la technique habituelle. Aucun phénomène lytique n'a pu être observé ni sur gélose, ni en bouillon malgré les 8 passages que nous avons effectués.

Ce résultant ne nous a pas paru surprenant ; nous avons en effet vérifié qu'une suspension de principe lytique est inactivée par séjour de 48 heures à 37° en présence de 1/10 de son volume d'eau oxygénée à 3 %, c'est-à-dire dans les conditions de l'expérience que nous venons de décrire.

Devant ces faits, nous ne nous expliquons pas les résultats obtenus par les auteurs américains.

V. — *Essais de production de bactériophage par culture de B. coli en bouillon alcalinisé.*

Les travaux de PLANTUREUX que nous avons exposés dans la première partie de ce chapitre ont permis à cet auteur d'obtenir des souches « lysogènes » par culture de bacilles de Shiga normaux sur des bouillons alcalinisés au moyen de 4, 5 ou 6 gouttes de soude normale par tube de 5 c.c. de milieu.

Le filtrat de ces cultures « lysogènes » en bouillon, provoque la lyse bactériophagique de cultures jeunes du même bacille, ayant vécu dans des conditions normales.

La même expérience répétée avec une souche de bacille de la typhose aviaire et une autre de paratyphique B, a donné le même résultat, mais cette fois, l'action lytique ne s'est manifestée qu'après plusieurs passages.

PLANTUREUX n'a pas envisagé le cas du bacille coli ; il nous a paru intéressant de le faire.

Nous avons opéré sur 3 souches de notre collection : Coli 1, Coli 10 et Coli Loire II. Chacune d'elles a été ensemencée dans 5 tubes contenant 5 c.c. de bouillon et on a ajouté respectivement 4, 5, 6, 7, 8 gouttes de soude normale aux 5 tubes de chaque série. Les tubes sont placés à l'étuve à 37° pendant une semaine. Nous avons constaté qu'au delà de 6 gouttes de soude normale, aucune culture n'est plus possible. Les tubes contenant 4, 5 et 6 gouttes de l'alcali, donnent par contre, dès le premier passage, une culture agglutinée qui, ensemencée légèrement sur gélose, donne des colonies toutes semblables et normales dans le cas du coli 1 et du coli 10. Dans le cas du coli Loire II, les colonies qui se forment sont de deux types : les unes sont rondes, bombées, luisantes et semblables à celles de la souche initiale ; quelques autres sont plates, irrégulières, rugueuses et semblables à celles observées par PLANTUREUX dans ses expériences sur le Shiga.

Trois autres passages effectués en milieu alcalinisé, dans les mêmes conditions que celles déjà indiquées, n'ont pas modifié l'aspect des colonies isolées ensuite sur gélose.

Chacune des premières cultures en bouillon alcalinisé, a été filtrée sur bougie Chamberland L3 et nous avons fait la recherche du bactériophage dans le filtrat en utilisant le coli sensible « urinaire ». Cette recherche s'est montrée négative, même après plusieurs passages dans le cas des coli 10 et coli 1 ; par contre, dès

le premier contact, la lyse bactériophagique s'est produite avec le filtrat de coli Loire II. La même recherche faite, dans chacun des cas, en utilisant comme souche détectrice, non plus le coli « urinaire » mais la souche homologue initiale (coli 1, coli 10, coli Loire II) n'a donné aucun résultat malgré plusieurs passages.

VI. — *Essais de production de bactériophage par culture de bacilles coli en milieu additionné de chlorure de calcium.*

PLANTUREUX, dans un autre travail que nous avons résumé, est parvenu, toujours avec des bacilles dysentériques, à obtenir des bactériophages par culture de ces microbes dans un bouillon additionné de chlorure de calcium. Après une incubation de 7 jours à 37°, l'ensemencement du contenu des tubes permet généralement d'obtenir des colonies « lysogènes ». Le plus souvent, un seul passage en milieu calcifié suffit pour produire la transformation ; parfois il en faut un second.

Comme on le voit, cette expérience est calquée sur la précédente consistant à cultiver le microbe en milieu alcalinisé, mais ici, l'alcali est remplacé par du chlorure de calcium.

Nous avons reproduit ces essais en utilisant les 3 souches qui nous ont déjà servi précédemment : coli 10, coli 1 et coli Loire II.

Chacune d'elles a étéensemencée dans 5 tubes contenant 5 c.c. de bouillon ordinaire. On a alors ajouté respectivement à chacun d'eux, 2, 4, 8 et 30 gouttes de solution stérile de chlorure de calcium à 2 %. Après incubation de 7 jours à 37°, on a étalé sur gélose une très petite quantité de culture de chaque tube. Dès le premier isolement, les cultures de coli Loire II nous ont donné des colonies d'aspect givré, semblables à celles observées par PLANTUREUX ; nous avons toutefois noté qu'il y en avait davantage (environ 50 %) dans les tubes ayant reçu seulement 2, 4 ou 8 gouttes de chlorure de calcium à 2 % que dans ceux ayant reçu 15 gouttes (10 %) ou 30 gouttes (aucune). Les cultures en milieu calcifié du coli 10 et du coli 1 ne nous ont donné par isolement sur gélose aucune colonie d'aspect givré malgré 3 passages. Dans le but d'y rechercher le bactériophage, toutes ces cultures en milieu calcifié ont été filtrées sur bougies L3 et les filtrats ont été ajoutés d'une part à des cultures jeunes de microbes homologues n'ayant subi aucun traitement, d'autre part, à des cultures jeunes du coli sensible « urinaire ». Les résultats relatifs à l'action sur cette dernière souche sont consignés ci-dessous.

SOUCHE	2 gouttes de CaCl_2 2 ^o / _o pour 5 cc.	4 gouttes de CaCl_2 2 ^o / _o pour 5 cc. bouillon	8 gouttes de CaCl_2 pour 5 cc. bouillon	15 gouttes de CaCl_2 pour 5 cc. bouillon	30 gouttes de CaCl_2 pour 5 cc. bouillon
Loire II	O	++ donnant ++++ après 1 passage	O	O	O
Coli 1	O	O	O	O	O
Coli 10	O	O	O	O	O

O = aucune lyse; ++ = éclaircissement net; ++++ = lyse totale.

On remarquera que seule la culture du coli Loire II faite dans 5 c.c. de bouillon additionné de 4 gouttes de CaCl_2 à 2 % a donné naissance à du bactériophage. Une plus forte ou une moins forte dose de CaCl_2 ont par contre donné aucun résultat. Par ailleurs aucune action bactériophagique n'a pu être décelée par action des mêmes filtrats sur les souches homologues coli Loire II, coli 1 et coli 10.

Aucune action non plus sur le coli « urinaire » ni sur les coli homologues, des filtrats provenant des trois passages que nous avons effectués à une semaine d'intervalle en bouillons calcifiés avec les souches coli 1 et coli 10.

Dans le but de confirmer le résultat positif obtenu avec la souche Loire II, nous avons répété la même expérience à trois reprises. Les deux premières fois, contrairement au résultat déjà obtenu, les filtrats de cultures de ce germe en milieu calcifié n'ont provoqué aucune lyse sur la souche sensible urinaire, même après 5 passages. La troisième fois, seule la culture ayant reçu 8 gouttes de chlorure de calcium contenait un bactériophage capable d'éclaircir légèrement une culture de coli « urinaire » ; nous avons pu en exalter l'activité et arriver après 4 passages à la lyse totale d'une culture légèrement trouble du même coli. La preuve qu'il s'agit bien de bactériophage nous a été fournie par la mise en évidence de phages sur gélose.

Nous n'avons pu trouver la raison pour laquelle le bactériophage ne se produit pas régulièrement à partir de la souche Loire II dans des conditions pourtant identiques. Nous pensons que la culture en milieu calcifié agit peut-être en stimulant un bactériophage très faible qui se trouvait préalablement dans la souche étudiée, celui-ci restant intracellulaire ne peut manifester son action. Accidentellement pourtant, quelques corpuscules lytiques pourraient quitter la cellule qui les héberge soit par suite

d'une lyse provoquée par un affaiblissement dans la résistance de cette cellule, soit pour une autre raison.

Peut-être aussi est-ce la souche détectrice qui varie. Il est possible que certaines de ces sous-cultures contiennent quelques cellules particulièrement sensibles à la lyse et permettent la mise en évidence d'un phage qui, dans d'autres conditions, aurait pu passer inaperçu.

Cette dernière interprétation peut trouver un fondement dans le fait suivant : Si l'on isole sur gélose des colonies d'une souche donnée, on constate qu'il existe une différence de sensibilité à l'action de bactériophages faibles des sous-cultures faites au moyen de chacune d'elles.

A la suite de ces expériences, nous remarquerons aussi qu'en aucun cas les deux souches de coli I et 10 n'ont donné naissance à du bactériophage. Faut-il rapprocher ceci du fait que par repiquage avec isolement sur gélose de leurs cultures en milieu calcfié, ces souches ne nous ont pas permis d'observer les colonies plates, irrégulières et rugueuses que nous avons vues avec la souche Loire II. Contentons-nous d'en faire ici la remarque, nous y reviendrons plus loin.

VII. — *Essais d'obtention du bactériophage par traitement des cultures de bacille coli avec du gel d'alumine.*

D'après BERNARD et GUILLERM, dont nous avons exposé les travaux, les cultures en bouillon de vibron cholérique contiennent du bactériophage, mais celui-ci ne peut se manifester par suite de l'action empêchante d'une substance se trouvant dans le milieu.

Cette substance étant adsorbable par l'alumine, on peut l'éliminer facilement de la culture qui possède dès lors des propriétés lytiques.

Rappelons que les auteurs ont utilisé une culture de vibrions ayant incubé 48 heures à l'étuve. Après centrifugation, le bouillon a été traité par du gel d'alumine dans des conditions non précises. Après séparation de cet adsorbant, le liquide clair a été concentré et précipité par une solution aqueuse saturée de sulfate d'ammonium. Le précipité obtenu contenait du bactériophage anticholérique.

Nous avons cherché à obtenir du bactériophage de 3 cultures microbiennes en suivant les indications ci-dessus, mais au lieu d'expérimenter sur des vibrions, nous avons opéré sur des souches de coli. Nous avons choisi à cet effet les souches X, Laffly et 1.

Nous avons préparé un gel d'alumine suivant WILLSTATTER en traitant une solution à 5 % de sulfate d'alumine par un léger excès d'ammoniaque. Un courant de vapeur permet l'élimination de cet excès d'alcali et l'activation du gel. Après 3 lavages par centrifugation, le dépôt d'alumine a été mis en suspension dans de l'eau distillée stérile de façon à obtenir une suspension à 2 %.

Des cultures de 48 heures, en bouillon, de chacune des souches de coli, ont été additionnées de leur volume de suspension de gel ; le mélange a été agité quelques minutes puis centrifugé. Le reste du traitement a été fait en suivant exactement la technique de BERNARD et GUILLERM indiquée ci-dessus, c'est-à-dire, concentration dans le vide (à 40°) du liquide clair et addition de solution aqueuse saturée de sulfate d'ammonium jusqu'à cessation de précipité. Après centrifugation, le précipité a été dissous dans du bouillon. Aucune activité lytique de ce liquide n'a pu être révélée dans aucun des 3 cas, en utilisant notre souche sensible « urinaire ». Aucune plage non plus, n'a pu être observée sur gélose.

Deux interprétations de ces résultats négatifs sont possibles :

1°) l'expérience de BERNARD et GUILLERM n'est pas réalisable avec l'espèce microbienne Coli ;

2°) les souches de vibron utilisées par les auteurs étaient lysogènes mais portaient un bactériophage peu actif qui a échappé aux auteurs dans la recherche préalable qu'ils ont faite pour vérifier la pureté de leurs souches.

Dans ce dernier cas, il faudrait tout de même admettre que, dans les expériences des auteurs, le traitement au gel d'alumine a permis d'augmenter l'activité du bactériophage anticholérique.

Nous ne nous expliquons cependant pas pourquoi ce principe lytique n'a pas été adsorbé par le gel d'alumine qui le fixe pourtant d'habitude avec intensité.

VIII. — *Essais d'obtention de bactériophage à partir de vieilles cultures de Coli.*

Nous avons signalé que OTTO, MUNTER et WINCKLER ont pu mettre en évidence des bactériophages dans certaines vieilles cultures en bouillon de bacilles des groupes Coli, typhi, dysentérique mais plus spécialement de ces deux derniers.

Nous avons voulu vérifier les constatations de ces auteurs et voir, si à partir de trois de nos souches de Coli, il est possible d'obtenir des principes lytiques par vieillissement des cultures en bouillon.

Nous avons opéré sur les souches Coli 10, Coli X et Coli Laffly.

Chacune d'elles a étéensemencée dans un tube de bouillon qui a été capuchonné et abandonné à l'étuve.

Des prélèvements ont été faits au bout de 1 mois, 1 mois 1/2 et 2 mois, ils ont été centrifugés et filtrés sur Bougie Chamberland L3. Nous avons essayé l'action de ces filtrats sur des cultures jeunes du coli sensible « urinaire » et nous avons effectué pour chacun d'eux huit passages dans les conditions habituelles.

Dans le cas des filtrats du coli 10 et du coli X, aucune lyse n'a pu être observée; par contre, le filtrat de la culture de LAFFLY datant de 1 mois nous a donné au troisième passage un éclaircissement net et une lyse totale au quatrième passage. La présence du bactériophage a été confirmée par la production de plages sur gélose.

Malgré 15 passages effectués avec les filtrats de culture du même coli LAFFLY de 1 mois 1/2 et 2 mois, nous n'avons pu obtenir le moindre éclaircissement de la culture détectrice.

On peut tenter d'expliquer ce fait de deux façons:

1°) Il est possible que les bactériophages « libérés » soient ensuite détruits ou inhibés par l'action du temps dans le milieu riche en produit d'autolyse microbienne où ils se trouvent. S'il en était ainsi, on comprendrait pourquoi la culture âgée de 1 mois contient du phage alors que les autres en sont exemptes;

2°) Les conditions de l'expérience ne permettent peut-être la formation de corpuscules lytiques que d'une façon tout à fait exceptionnelle.

La première interprétation nous paraît à rejeter car, en ajoutant du bactériophage à un filtrat de vieille culture, nous avons pu le retrouver après un séjour de 2 mois à l'étuve.

La deuxième hypothèse nous paraît plus exacte car, répétant la même recherche de bactériophage dans 7 filtrats de 7 cultures différentes âgées de 1 mois du même coli Laffly, nous n'avons pu dans aucun de ces nouveaux essais obtenir de lyse visible malgré les passages effectués.

EXPÉRIENCES DE BÉGUET

La formation de bactériophages par culture de souches microbiennes normales en présence de leurs produits de métabolisme a été observée également par BÉGUET sur le bacille dysentérique, mais dans des conditions expérimentales différentes. Ainsi que nous l'avons dit, cet auteur aensemencé la surface de la gélose contenue dans une boîte de Pétri en dessinant un anneau large, laissant au centre une surface libre de 1 cm.³ environ. Après 48 h.

d'incubation à 37°, il a ensemencé cette fois la zone centrale avec la même culture. Après une nouvelle incubation de 48 h., l'auteur a observé des colonies très grêles variant, dit-il, du type « limpide » au type « givré » puis opaque ⁽¹⁾. Ces dernières donnent des cultures agglutinées en bouillon, dans lesquelles il a pu mettre en évidence du bactériophage antidysentérique.

Nous avons répété ces expériences au moyen des souches de coli Laffly, 10 et Loire II de notre collection. Dans le cas du coli 10 et du coli Loire II, nous avons observé une culture très grêle dans la partie centrale de l'anneau. La souche Laffly ne nous a donné aucune pousse dans cette zone.

Par repiquage ⁽²⁾ des très fines colonies ayant poussé, nous n'avons pas pu observer ce que BÉGUET a vu avec le Shiga : Toutes les colonies que nous avons obtenues étaient identiques et semblables à la souche initiale. Aucune colonie « givrée » n'a pu être observée. Des cultures en bouillon de 4 jours faites, pour chaque souche, avec des colonies isolées, ont été additionnées d'une anse de culture de 24 heures en bouillon de la souche initiale homologue. Après 24 heures d'étuve, nous avons filtré et essayé l'action lytique éventuelle du filtrat, sur le coli sensible « urinaire » et sur le coli homologue initial. Aucune lyse ni sur gélose, ni en bouillon n'a pu être observée malgré 8 passages effectués avec chaque filtrat.

Les expériences réalisées par BÉGUET sur le B. Shiga ne semblent donc pas généralisables aux B. Coli ; tout au moins à ceux avec lesquels nous avons opéré.

EXPÉRIENCES DE FUKUDA

Les expériences de FUKUDA diffèrent des précédentes en ce que les cellules microbiennes subissent le vieillissement en l'absence de leurs produits de métabolisme. Ceux-ci, après une première incubation à 37°, sont éliminés par centrifugation et remplacés par du bouillon neuf qui est à son tour ensemencé avec une petite quantité de microbes jeunes. Après 24 heures, une

(1) L'auteur entend sans doute par colonies du « type limpide », celles qui sont transparentes à la lumière. Ces colonies sont sans doute celles qui correspondent au type « Smooth » de Arkwright alors que les colonies « givrées opaques » doivent être les types « Rough » du même auteur. Nous reviendrons plus loin sur ce point.

(2) Les colonies ont été prélevées à la loupe au moyen d'un fil de platine terminé par un V à branches écartées. Pour le repiquage il suffit de poser très légèrement la pointe du fil sur la gélose au voisinage du fond du tube. On étale alors les germes déposés au moyen de la base du V. On obtient d'emblée des colonies isolées.

nouvelle centrifugation rassemble au fond du tube tous les germes microbiens. On décante le liquide clair que l'on remplace par du bouillon ordinaire, etc...

FUKUDA a pu constater qu'après un certain nombre de ces traitements, du bactériophage apparaissait dans les liquides clairs décantés après centrifugation. Soulignons que l'auteur a réussi cette expérience seulement avec le bacille dysentérique.

Nous avons voulu voir si du principe lytique pouvait être produit dans les mêmes conditions avec des bacilles coli. Nous avons utilisé les 3 souches : coli Laffly, coli 10 et coli 1. Pour la commodité des expériences, nous avons employé un tube étranglé à 1 cm. environ de son extrémité supérieure. Dans cette portion, on peut disposer un bouchon de coton et centrifuger aseptiquement sans crainte de le précipiter au fond du tube. L'étranglement permet le passage d'une pipette fine avec laquelle on prélève le liquide clair. Une autre pipette effilée sert à introduire le bouillon neuf et à pratiquer l'ensemencement.

En dehors de cela, nous avons opéré exactement comme l'a fait FUKUDA.

Pour chacune des souches, nous avons fait le traitement pendant 12 jours de suite sans observer ni en bouillon, ni sur gélose la moindre action lytique des liquides recueillis après centrifugation, sur notre souche sensible « urinaire ».



IX. — *Essais de production de bactériophage anticoli par la technique de Rosenthal.*

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons exposé en détail la technique qui a permis à ROSENTHAL d'obtenir des bactériophages actifs sur différentes espèces microbiennes parmi lesquelles : les bacilles coli, typhiques, paratyphiques, pyocyaniques, sur les pneumocoques, les streptocoques et même sur les gonocoques.

Nous avons voulu voir si ce mode opératoire est applicable de façon régulière aux bacilles coli et nous avons répété l'expérience en utilisant 3 des souches de coli qui nous ont déjà servi précédemment : coli 1, coli 10, coli Loire II.

Rappelons que le dispositif de ROSENTHAL est simplement constitué par une bougie L5 de petit modèle, fixée à un tube de verre au moyen d'un morceau de coton serrant sa partie vermiculée. C'est en somme le dispositif que l'on utilise pour les filtrations bactériologiques. Cet ensemble est stérilisé au four à flamber.

Pour nous conformer aux indications de l'auteur, nous avons

introduit une culture microbienne jeune (6 h.) à la fois dans la bougie et dans le tube, en quantité telle que le niveau soit le même, et nous avons mis à l'étuve à 37° pendant 48 heures.

Au bout de ce temps, nous avons prélevé une partie du liquide contenu dans le tube de verre et nous l'avons introduit aseptiquement dans la bougie d'un dispositif analogue. Le tube de verre de ce nouveau dispositif ayant reçu préalablement une culture jeune du même microbe.

Après une nouvelle incubation de 48 heures, la même suite d'opérations a été rejetée, dix fois pour chaque souche et à chaque fois, un prélèvement de quelques centimètres cubes a été effectué sur la culture microbienne contenue dans le tube de verre. La recherche du bactériophage a été faite sur ces liquides sans aucun résultat malgré les 6 passages que nous avons effectués avec chacun d'eux.

Des résultats entièrement négatifs ont été également obtenus par M^{lle} LE SOUDIER et J. VERGE qui, avant nous, avaient tenté de répéter les expériences de ROSENTHAL.

X. — Conclusion.

La conclusion qui se dégage des expériences que nous avons effectuées est la suivante : Partant de souches microbiennes normales de bacille coli, nous n'avons pu obtenir que dans trois cas seulement : culture en présence de chlorure de calcium, culture en milieu alcalinisé et vieillissement de cultures en bouillon — mais de façon irrégulière — la mise en liberté de bactériophage.

En dehors de cela, nous n'avons pu vérifier ni étendre à l'espèce microbienne coli, les résultats obtenus avant nous par d'autres auteurs.

Quelles sont les raisons de ces échecs ? Nous pensons qu'elles doivent tenir à trois causes principales :

1°) Les techniques décrites ont été le plus souvent pratiquées avec des bacilles dysentériques ; or, ceux-ci constituent l'espèce la plus apte à subir la bactériophagie. Ce qui est possible avec les bacilles dysentériques ne l'est peut-être pas avec les bacilles coli.

2°) Les expérimentations qui ont pu produire du bactériophage à partir de bacilles coli, ont sans doute utilisé des souches données de qualités particulières ; elles se trouvaient peut-être dans un état symbiotique bactérie-bactériophage peu stable et le traitement pratiqué a peut-être eu pour effet de rompre la symbiose au profit du bactériophage.

Il est à remarquer d'ailleurs que ces expérimentateurs ont appliqué leur procédé à une seule ou à un très petit nombre de

souches (1) et qu'en aucun cas ils n'ont affirmé la possibilité d'opérer sur une souche quelconque. Il faut noter aussi qu'aucun auteur n'a publié de confirmation de leurs expériences.

3°) Les auteurs des techniques décrites disposaient peut-être de souches détectrices plus sensibles que la souche « urinaire » que nous avons employée — et qui leur a permis de mettre en évidence des principes lytiques qui sont passés inaperçus dans nos expériences.

Quoi qu'il en soit, il ne semble pas que les techniques décrites puissent permettre la préparation régulière de bactériophages anticoli à partir de souches microbiennes normales.

★★

Ce travail nous a en outre permis de faire la remarque suivante : Dans les 3 expériences ou nous avons pu accidentellement mettre en évidence du bactériophage à partir de certaines de nos souches, nous avons observé l'apparition de colonies du type « R » (suivant ARKWRIGHT).

Nous nous sommes demandés s'il n'y a pas un parallélisme entre la production de ces formes « R » (phénomène connu également sous le nom de « dissociation ») et la mise en liberté de bactériophage dans une culture.

L'intérêt que présente cette question nous a incité à l'étudier.

Dans le V^e chapitre de cette thèse, nous donnerons donc une première partie dans laquelle nous passerons en revue l'essentiel de ce que l'on sait sur la variation S-R ; puis nous exposerons les expériences que nous avons faites : 1°) pour la détermination du caractère « R » ou « S » de nos souches ; 2°) pour la préparation de quelques souches « R » de coli.

Dans une deuxième partie, nous traiterons de la variation S-R dans ses rapports avec la bactériophagie et nous envisagerons successivement les travaux antérieurs et les travaux personnels que nous avons effectués.

1) A part Rosenthal. Mais nous avons vu que les expériences de cet auteur n'ont pu être vérifiées par d'autres.

CHAPITRE V

LA TRANSFORMATION S—R

PREMIÈRE PARTIE

A. — FAITS ESSENTIELS CONNUS

Le bactériologue ARKWRIGHT (198) a mis en évidence dans les cultures de bacilles des groupes coli, typhi, dysentériques, deux formes microbiennes différentes : la première dite R (de l'anglais « rough » qui signifie rugueux) est constituée par des colonies à surface plate, mate, rugueuse et à bords irréguliers ; examinées à la lumière, ces colonies se montrent opaques. Les colonies de l'autre forme, désignée par la lettre S (de l'anglais « smooth » qui signifie lisse) sont au contraire lisses, plus ou moins bombées, rondes et à bords bien réguliers. Elles sont transparentes à la lumière.

L'étude de ces curieuses colonies rugueuses a été ensuite entreprise, par ARKWRIGHT lui-même puis par de nombreux expérimentateurs parmi lesquels il faut citer HADLEY.

Dans les pages qui suivent, nous allons résumer les connaissances essentielles qui résultent de ces travaux et plus spécialement celles qui ont trait aux microbes du Groupe Coli. Nous exposerons d'abord ce que l'on sait des divers caractères des formes rugueuses ; nous verrons ensuite dans quelles conditions peut se faire la transformation S—R et la transformation inverse. Nous dirons enfin quelques mots de la signification de cette variation.

I. — *Caractères des formes R.*

En dehors de leur aspect extérieur dont nous venons de parler, les colonies rugueuses présentent d'autres caractères qui les différencient des colonies lisses. C'est d'abord la consistance de la matière microbienne qui est différente ; le fait est particulièrement net avec le bacille coli ; alors que la substance microbienne des colonies S est liée et homogène, celle des colonies R est granuleuse et sèche.

Lorsqu'on cherche à prélever, au moyen d'un fil de platine, une portion d'une de ces colonies R, on observe parfois un déplacement de l'ensemble de la colonie comme si celle-ci n'adhérait pas au milieu et comme si tous les éléments microbiens la constituant étaient liés les uns aux autres. Il semble qu'on puisse expliquer ce fait par les observations de BISSET sur la structure intime de ces colonies. Cet auteur est arrivé à faire des coupes de ces colonies microbiennes et l'examen microscopique lui a montré que, alors que dans les formes S les cellules microbiennes sont séparées les unes des autres, celles-ci sont réunies en filaments enchevêtrés dans les formes R.

L'examen microscopique de préparations obtenues par coloration au gram, de germes R montre habituellement des formes renflées et courtes d'aspect coccobacillaire.

La transformation d'un germe mobile S en R entraîne habituellement la perte des flagelles et par suite la perte de la mobilité. Le fait n'est cependant pas absolument général et on connaît des types R mobiles.

Si nous ajoutons que les formes S sont moins résistantes à la chaleur et au vieillissement que les formes rugueuses, nous en aurons fini avec les caractères physiques de ces dernières.

D'autres caractères sont différents d'une forme à l'autre ; nous avons déjà mentionné l'aspect des cultures R sur gélose ; nous n'y reviendrons pas.

En bouillon, lorsqu'on observe une culture de 24 heures de la forme lisse, on constate la plupart du temps que le bouillon s'est troublé uniformément et qu'il n'y a au fond qu'un dépôt très faible. Il n'en est pas de même avec les cultures de la forme rugueuse ; celles-ci donnent un dépôt agglutiné au fond du tube et le bouillon surnageant reste entièrement limpide.

Cette agglutination serait due aux substances salines contenues dans le bouillon. En fait, on peut l'observer lorsqu'on émulsionne des germes R dans une solution de chlorure de sodium. Elle se produit plus ou moins facilement suivant la souche mise en œuvre et suivant la teneur en sel de la solution.

Les réactions fermentatives des formes rugueuses sont qualitativement les mêmes que celles des formes lisses, mais elles sont atténuées par rapport à ces dernières.

Les caractères immunologiques sont eux aussi différents : les souches R sont généralement de moindre virulence que les formes R correspondantes ; elles sont plus phagocytées, plus sensibles à l'alexine que ces dernières, enfin chacune de ces deux formes, rugueuse et lisse, n'agglutine qu'avec le sérum qui lui

correspond ; le sérum anti R agglutine seulement les formes R, le sérum anti S agglutine seulement les formes S.

Pour finir, précisons que la structure antigénique des formes R est caractérisée par la perte de l'antigène O. Seul subsiste l'antigène H dans les formes mobiles.

★★

En dehors des caractères déjà indiqués, il y a lieu d'ajouter deux réactions qui sont :

1°) La réaction à la trypaflavine (199) ;

2°) La réaction de MILLON.

La première se réalise en mettant sur une lame bien propre une goutte de solution au 1/500 de trypaflavine dans du sérum physiologique ⁽¹⁾ et en y émulsionnant une trace de culture. On note s'il y a ou non agglutination. Dans le premier cas, la culture étudiée est du type R.

La réaction de MILLON consiste à ajouter à 3 c.c.³ d'une suspension dense de bacilles dans l'eau distillée, 0,5 c.c. à 1 c.c.³ de réactif de MILLON ⁽¹⁾ puis plonger le tube renfermant ce mélange pendant 5 minutes dans l'eau bouillante. Une agitation de une minute précède la lecture. Les cultures R donnent dans ces conditions une agglutination nette.

★★

Le tableau XIII ci-après groupe tous les caractères que nous venons d'énumérer.

II. — *Formes intermédiaires.*

Entre les formes lisses et les formes rugueuses dont nous venons de donner les caractères, il existe un certain nombre d'intermédiaires qui se rapprochent plus spécialement de l'une ou l'autre forme. On les désigne habituellement par les initiales Sr et sR suivant qu'ils sont plus près, de la forme lisse ou de la forme rugueuse.

Les cultures en bouillon de ces formes intermédiaires donnent une agglutination partielle se traduisant par un amas microbien en culot, surmonté d'un liquide trouble.

(1) La solution doit être fraîchement préparée.

(1) Le réactif de MILLON se prépare de la façon suivante : Faire dissoudre à froid 20 grammes de mercure dans 20 grammes d'acide azotique pur (codex) et ajouter à la solution 2 fois son volume d'eau distillée, soit environ 30 c.c.³. Laisser reposer 24 heures et décantier le liquide qui constitue le réactif. La réaction doit être effectuée avec un réactif fraîchement préparé.

TABLEAU XIII

Caractères des formes microbiennes S et R du bacille coli

CARACTÈRE	FORMES S	FORMES R en dérivant
Structure des colonies	Éléments microbiens séparés Matière liée et homogène	Filaments Matière granuleuse et sèche
Mobilité		Généralement perte de la mobilité
Aspect des colonies sur gélose	Colonies lisses, rondes, bombées, luisantes, transparentes	Colonies plates, contours irréguliers, surface rugueuse et mate, opaques à la lumière
Croissance en bouillon	Trouble uniforme	Dépôt microbien au fond du tube, surmonté de bouillon limpide
Fermentations		- id. - que celles de S mais généralement moins actives
Agglutination par le sérum spécifique	Agglutination en gros grumeaux (le sérum anti S agglutine seulement S)	Agglutination en très petits grumeaux (Sérum anti R agglutine seulement R)
Virulence		Généralement moins virulent que S
Phagocytabilité		Généralement augmentée
Sensibilité à l'alexine		id.
Structure antigénique	Présence d'antigène O Présence ou absence d'antigène H	Absence d'antigène O Présence ou absence d'antigène H
Réactif à la trypaflavine	Pas d'agglutination	Agglutination
Réactif de Millon	id.	id.

Les autres caractères et les réactions que nous avons cités (MILLON, trypaflavine) ne sont également que partiels.

L'existence de ces intermédiaires laisse penser que la transformation S—R n'est pas brutale mais se fait de façon progressive.

III. — Conditions de la transformation.

Des conditions expérimentales assez diverses permettant d'obtenir la transformation S—R. Le moyen le plus employé consiste à laisser vieillir des cultures microbiennes en bouillon, à la température du laboratoire, dans un endroit obscur.

ARKWRIGHT (200) l'a le premier obtenu en abandonnant pendant un mois des cultures microbiennes en bouillon. L'étalement sur gélose permettait d'obtenir des colonies présentant l'aspect rugueux. D'autres auteurs ont cherché à se rendre compte de l'influence du milieu de culture sur la dissociation ; KOSER et STYRON (201) ont ainsi étudié l'action de la concentration de peptone et ont trouvé qu'une concentration de 20 % de ce produit dans le milieu de culture est beaucoup moins efficace qu'en concentration de 0,5 à 1 %.

DIENST (202) a laissé vieillir des cultures dans du bouillon ordinaire additionné de 0,5 , 3, 5, 10 fois la quantité normale de peptone. Des prélèvements effectués de temps en temps lui ont montré qu'il faut parfois plusieurs semaines avant de pouvoir observer des colonies Sr (colonies S avec tendance aux caractères R). Si le vieillissement continue, des colonies sR (caractère R plus marqué) se forment en petite proportion. Finalement, des colonies typiquement R se forment au bout de plusieurs mois. Le même auteur a étudié la dissociation dans d'autres milieux et en particulier le milieu à la caséine digérée de KULP et RETTGER (203) ; ce milieu paraît très favorable. On sait que la caséine est une protéine riche en tryptophane ; aussi DIENST a cherché si l'addition de tryptophane était capable d'accentuer le phénomène de dissociation. Il n'en a rien été et l'eau peptonée additionnée de cet aminoacide s'est montrée sensiblement de même valeur que l'eau peptonée simple.

Les milieux synthétiques n'ont pas donné de bons résultats.

Les produits du métabolisme microbien paraissent capables d'accélérer la variation S — R. DIENST a inoculé des souches S de *B. dysentérique* dans des filtrats de cultures homologues ayant vécu 10 jours dans un milieu à base de caséine digérée. Après 14 jours il a obtenu 20 à 25 % de formes R. Par contre, un filtrat préparé à partir d'une culture R de même âge ne produit pas une accélération de la variation d'une souche S.

L'action de l'immunsérum est connue depuis GRIFFITH qui a réussi à produire une forme R de pneumocoque par croissance d'une culture S dans du bouillon additionné d'immunsérum homologue.

D'autres auteurs ont pu confirmer ce résultat : REIMANN (204) sur le pneumocoque ; DULANEY (205) sur le coli ; NUNGETER sur les *B. anthracis*, etc... Pourtant DIENS (*loc. cit.*) travaillant sur le *B. Shiga* a trouvé que le type S de ce microbe, inoculé dans du sérum homologue, ne présente qu'une faible tendance à la transformation en R même après un vieillissement de 74 jours.

De plus, cet auteur ne trouve pas toujours dans le cas du B. Shiga de différence entre l'action du sérum homologue et celle du sérum normal. HADLEY (206) a remarqué que la dissociation microbienne se produit au cours des phénomènes d'adaptation des microbes aux antiseptiques des plus divers ; il cite le violet de gentiane, l'acétate et l'oxalate de Na, le bichlorure de mercure, le nitrate de Cd, le phénol. HADLEY cite également la bile, le chlorure de sodium en concentrations élevées, la salive, etc... O'NEAL (207) emploie après HADLEY (208) du bouillon au chlorure de lithium et du bouillon à la pancréatine.

L'inanition paraît aussi dans certains cas favoriser la transformation. C'est ainsi que BRAUN et SCHAEFFER (209) opérant sur le *Proteus* X 19 ont pu l'obtenir par passages sur agar contenant très peu de milieu nutritif. FEILER (210) a pu aboutir au même résultat en utilisant le bacille typhique.

Signalons aussi que la culture en anaérobiose serait, pour certains microbes aérobies facultatifs S un moyen propre à stimuler la transformation en R (ROEBSTER [211]).

Pour finir, ajoutons que le bactériophage a été considéré par HADLEY comme un agent actif de dissociation. Nous développerons plus longuement cette question dans les pages qui suivent.

Il est à remarquer que les moyens employés pour provoquer la transformation S—R, que nous venons de passer en revue, sont très différents les uns des autres. Ils ont pourtant entre eux un point commun : ils mettent le microbe dans des conditions qui lui sont défavorables.

Une question se pose maintenant : toutes les espèces microbiennes lisses sont-elles capables de subir la transformation dans la forme rugueuse et, dans une même espèce, toutes les souches ont-elles la même aptitude ?

Bien qu'aucune étude systématique n'ait été faite, il semble probable que la réponse à la première question soit affirmative. On connaît en effet des formes R chez des représentants d'espèces microbiennes les plus diverses, pathogènes et saprophytes, sporogènes et asporogènes, aérobies et anaérobies.

Par contre, dans une même espèce, certaines souches se laissent facilement transformer alors que d'autres sont réfractaires et conservent leurs caractéristiques lisses, quel que soit le traitement auquel on les soumette.

Il est à noter à ce sujet, ainsi que HADLEY l'a fait observer, que ces dernières souches présentent la particularité d'être résistantes au bactériophage.

Voyons maintenant si le passage de la forme R à la forme S est possible et quelles en sont les conditions.

IV. — Transformation inverse R—S.

Cette transformation paraît beaucoup plus difficile à réaliser que la précédente.

ARKWRIGHT (198) a le premier remarqué que les repiquages fréquents favorisent le retour à la forme S ; mais DE KRUIF (212) et aussi SCHULTZE (214) ne sont pas parvenus à observer cette transformation et SAVAGE et WHITE (213) opérant avec une *Salmonella* considèrent que la forme R constitue un changement permanent et irréversible.

D'autres auteurs comme REIMANN (204) aboutissent à une conclusion analogue. Ce dernier expérimentateur opérait sur des cultures obtenues à partir d'une cellule unique de pneumocoque. Travaillant sur le même microbe, GRIFFITH (215) a constaté que les souches R ne peuvent être reconverties complètement dans le type S.

Malgré ces échecs, il semble bien que le passage des formes R aux formes S soit tout de même possible. C'est ainsi que JORDAN (216) a montré qu'à partir d'une seule cellule de paratyphique B, on peut produire la transformation R—S par repiquages fréquents (2 fois par jour) dans du bouillon d'infusion de veau à pH 7,4. Au bout de 36 jours, le rapport R/S a été pour une souche de 3/1 et pour une autre de 5/1.

DULANEY (205) puis LARKUM (217) sont également parvenus à produire des formes S avec le bacille coli et avec le bacille typhique, par culture de formes R dans l'immunsérum R homologue.

BURNET (218) a pu obtenir des colonies typiques S à partir de cultures R de bacilles enteridis Gaertner, et ceci au moyen de bactériophages qui ne sont actifs que sur la forme R.

Enfin, BORDET et RENAUX (219) ontensemencé séparément les deux types R et S d'un bacille coli dans des tubes contenant un mélange à parties égales de bouillon et de sérum de cobaye ou de lapin, chauffé à 56°. Après quelques repiquages destinés à acclimater leurs microbes à ce milieu, ils les ontensemencés dans du bouillon sérum non chauffé. Au bout de 3 à 4 heures, le liquideensemencé avec le type S est déjà trouble ; l'autre est limpide et le reste plusieurs heures ; mais, le lendemain, il présente un trouble abondant constitué par une culture ayant tous les caractères du type S.

Il est intéressant de constater que les sérums (spécifiques ou non) constituent justement l'un des moyens employés pour pro-

duire la transformation S—R. Puisque ces produits réalisent également la transformation inverse, il est permis de se demander s'il n'y a pas, sous leur influence, formation d'un équilibre aboutissant à un pourcentage de l'une ou l'autre forme pour une souche donnée.

A ce sujet, COWLEY (220) expérimentant sur le streptocoque, a rapporté que même dans les formes R les plus extrêmes, il existe un petit nombre d'éléments S.

V. — *Signification de la transformation S—R.*

Lorsqu'on parle de la transformation S—R des bactéries, on a l'habitude de la désigner sous le nom de variation S—R. On sait que la variation est une modification qui peut se produire chez les individus d'une espèce donnée sous certaines influences. Chez les bactéries, ces influences peuvent être très diverses : température d'incubation, présence dans le milieu de certaines substances antiseptiques, abaissement de la tension superficielle, de la pression osmotique, etc... et elles peuvent manifester leurs effets sur un ou plusieurs caractères (morphologie, pigmentation, perte de spores, etc...) du microbe soumis à leur action.

Il faut cependant bien noter que ce qui caractérise ces changements, c'est qu'ils ne sont pas durables et que les caractères primitifs du microbe réapparaissent lorsque cesse la cause qui les a changés. Ils réapparaissent cependant plus ou moins lentement suivant la durée et l'intensité de l'action modificatrice.

D'après ce que nous venons d'exposer, il ne semble pas que la transformation S—R puisse être considérée comme une variation. Les formes R sont en effet parfaitement stables et, ainsi que nous l'avons vu, le retour à la forme S n'est possible que dans certaines conditions.

Il ne semble pas non plus qu'on puisse donner le nom de mutation à la transformation S—R. Une mutation est en effet un changement brusque, profond, modifiant le patrimoine héréditaire des germes, d'une façon définitive. Or, nous avons vu que le passage des formes lisses aux formes rugueuses, se fait sans brutalité puisque, au contraire, on peut mettre en évidence des formes intermédiaires. Par ailleurs, les formes rugueuses possèdent les mêmes caractères biologiques que les formes lisses dont elles dérivent ; ceux-ci étant seulement atténués.

Si la transformation S—R n'est ni une variation, ni une mutation, quelle signification peut-on lui attribuer ? La plupart des auteurs ne s'étendent pas sur cette question ; seul HADLEY prend

position et pense que les formes R seraient l'un des aspects d'un cycle vital chez les bactéries.

★★

Après cet exposé des connaissances essentielles sur la transformation S—R, nous allons décrire les expériences que nous avons faites : 1°) pour la détermination du caractère R ou S de nos souches ; 2°) pour la préparation de quelques souches R de coli que nous utiliserons dans la deuxième partie de ce chapitre.

B. — TRAVAUX PERSONNELS

I. — *Caractères R ou S de nos souches.*

Nos essais ont porté sur les 16 souches dont nous avons précisé les caractères biologiques au chapitre premier. Nous avons noté cette fois pour chacune d'elles : 1°) l'aspect des colonies sur gélose ; 2°) le trouble homogène où l'agglutination des cultures en bouillon après 24 heures d'étuve ; 3°) l'agglutination avec le réactif à la trypaflavine dans les conditions déjà décrites ; 4°) l'agglutination par le réactif de Millon.

Le tableau XIV ci-dessous donne les résultats obtenus.

On peut voir à l'examen de ce tableau qu'en dehors de la souche rugueuse J provenant de la collection de l'Institut Pasteur (souche que nous avons fait figurer à titre de comparaison) et de la souche Jean dont nous parlerons plus loin, aucune des autres ne présente les qualités strictement R, c'est-à-dire la positivité des 4 essais.

On peut constater par contre, que 4 de ces souches (Port, Th, Laffly, phéné) sont typiquement S en raison de la négativité des 4 caractères.

Les autres, c'est-à-dire le plus grand nombre, s'éloignent un peu des formes S typiques et possèdent certains caractères comme l'irrégularité de la forme des colonies, l'aspect légèrement rugueux et parfois moins bombé de la surface, qui les rapprochent de la forme intermédiaire Sr.

Les 2 autres caractères qui permettent l'identification des formes R : l'agglutination des cultures en bouillon et la réaction de Millon, se sont montrés négatifs sur l'ensemble de ces souches.

Revenons maintenant à la souche « Jean » qui, ainsi que nous l'avons vu, n'est pas un bacille coli mais un bacille aérogènes (suivant MALCOLM).

Nous avons déjà parlé de cette souche à propos de la recherche

TABLEAU XIV
Caractères R et S de nos souches

NOM de la souche microbienne	ASPECT DES COLONIES SUR GÉLOSE	CULTURE de 24 h. en bouillon	RÉACTION à la trypa- vine	RÉACTION de Millon	Caractère R ou S
Th	Colonies rondes, bombées, bords réguliers, surface lisse, luisantes.	Trouble homogène	—	—	S
Port	id.	id.	—	—	S
4	Colonies rondes, légèrement bombées, bords réguliers, surface légèrement rugueuse mais luisante.	id.	+	—	Sr
10	id.	id.	+	—	Sr
Loire II	id.	id.	—	—	Sr
Laffly	Colonies rondes, bombées, bords réguliers, surface lisse, luisante.	id.	—	—	S
X	Colonies rondes, légèrement bombées, bords un peu irréguliers, surface légèrement rugueuse mais luisante.	id.	—	—	Sr
Phéné	Petites colonies rondes, bombées, bords réguliers, surface lisse et luisante.	id.	—	—	S
1	Colonies de forme arrondie, peu bombées, bords réguliers, surface légèrement rugueuse, luisante.	id.	+	—	Sr
Val 1	id.	id.	+	—	Sr
urinaire	Colonies rondes, légèrement bombées, bords réguliers, surface lisse.	id.	+	—	Sr
Val 2	Colonies de forme arrondie, bombées, surface lisse, bords réguliers, luisante.	id.	+	—	Sr
Val 3	Colonies de forme arrondie, peu bombées, bords un peu irréguliers, surface légèrement rugueuse, luisante.	id.	+	—	Sr
1108	Colonies rondes, bombées, bords réguliers, surface lisse, luisante.	id.	+	—	Sr
1109	id.	id.	+	—	Sr
Jean	Grosses colonies rondes, bombées, bords réguliers, aspect muqueux, luisantes.	id.	+	+	
J	Colonies de forme irrégulière, plates, surface rugueuse, mate.	Culot agglutiné bouillon surnageant clair	+	+	R

du caractère lysogène de nos microbes. Nous avons vu que peu après son isolement, elle était porteuse de bactériophage et qu'elle avait à ce moment les caractères du bacille coli. Après un an environ de repiquages, elle est devenue résistante aux principes lytiques et a cessé d'être lysogène ; tout au moins en utilisant comme détecteur notre coli sensible « urinaire ».

Il est curieux de remarquer que cette souche, dont les colonies sont parfaitement rondes, bombées, lisses et luisantes, donne cependant une réaction de Millon positive, bien que ses cultures en bouillon ne soient pas agglutinées.

Cette observation nous confirme dans l'opinion que ne doivent être considérées comme strictement R que les souches possédant l'ensemble des 4 caractères. Elle nous permet aussi de penser qu'il y a peut-être un rapport entre la présence du bactériophage se trouvant sous forme libre dans une bactérie (souches lysogènes) ou sous forme dissimulée (par exemple souches cryptolyso-gènes de Lominski) et la positivité de la réaction de Millon.

II. — Préparation de quelques souches « R » .

Nous n'avons pas cherché à étudier systématiquement les diverses méthodes connues ; notre but a été simplement de préparer quelques souches R que nous destinons à des essais ultérieurs. Nous donnerons ici le compte rendu des expériences qui nous ont permis d'obtenir de telles souches et nous ajouterons à ce propos quelques observations.

a) *Vieillessement des cultures en bouillon à la caséine.* — Nous avons vu d'après DIENST (*loc. cit.*) que le milieu à la caséine digérée, préconisé par KULP et RETGER (221) est parmi ceux qui donnent les meilleurs résultats pour la transformation S—R par vieillessement de cultures.

Nous avons préparé un peu de ce milieu en suivant les indications de l'auteur. Voici le mode opératoire employé :

On délaye 100 gr. de caséine dans 300 c.c.³ d'eau et on ajoute peu à peu ce mélange dans une solution bouillante de 10 gr. de carbonate de soude dans 700 c.c.³ d'eau. Après chaque addition, on agite fortement jusqu'à dissolution ; on refroidit alors à 40° et on ajoute 5 gr. de pancréatine émulsionnée dans 20 c.c.³ d'eau, puis 25 c.c.³ de chloroforme. On bouche et on met au thermostat à 37° pendant 48 heures. On neutralise ensuite par l'acide chlorhydrique dilué (10 c.c.³ de HCl 1/10) et on amène à pH 7,4. On stérilise 1/2 heure à 120°, on filtre, on répartit en

tubes qui sont ensuite stérilisés par autoclavage de 1/2 heure à 115°. Le bouillon obtenu est parfaitement limpide.

Nous avons expérimenté sur les souches de coli « Port », « Loire II » et « Phéné ». Chacune d'elles a été ensemencée dans un tube du bouillon ci-dessus. Après 24 heures d'étuve, les cultures ont été capuchonnées et abandonnées pendant deux mois à la température du laboratoire, dans un endroit obscur. Au bout de ce temps, nous avons observé l'aspect suivant de ces cultures :

Coli « Port » : Bouillon trouble avec léger dépôt au fond ;

Coli « Loire II » : Bouillon limpide, dépôt au fond, voile épais en surface ;

Coli « Phéné » : Comme « Loire II » mais le bouillon est légèrement trouble.

Comme on le voit, l'aspect des cultures vieilles est différent. Notons dès maintenant qu'il est en rapport avec le changement en forme rugueuse de la souche : le milieu étant d'autant plus clair que la transformation a été plus profonde.

Après agitation, une trace de chacune de ces cultures a été alors ensemencée sur gélose de façon à obtenir des colonies isolées. Voici la description des colonies obtenues et le résultat de leur comportement vis-à-vis des 2 réactifs : Millon et trypanflavine (tableau XV).

TABLEAU XV

NOM de la souche	ASPECT des colonies	ASPECT de la culture en bouillon 24 heures	TRYPA- FLAVINE	MILLON	FORME
Port (S)	Petites colonies rondes, luisantes, surface lisse, bords réguliers.	Trouble homogène	—	—	S
Loire II (Sr)	Colonies plates, rugueuses, bords irréguliers, surface mate.	Agglutination	+	+	R
Péné	Colonies rondes, plates mais avec une légère surélévation au centre. Surface un peu rugueuse mais luisante.	Trouble avec culot au fond	+	+	SR

± = agglutination partielle. SR = forme intermédiaire.

Les isollements faits à partir de ces vieilles cultures au bout d'un temps plus prolongé (2 mois 1/2 - 3 mois) nous ont donné le même résultat.

On peut voir d'après le tableau ci-dessus que sur les 3 souches utilisées, seul le coli « Loire II » a subi la transformation en forme rugueuse typique.

Le coli « Phéné » qui était primitivement S est devenu SR en raison de l'aspect de ses colonies sur gélose et de la positivité de la réaction à la tryptoflavine. Par contre, le coli « Port » n'a subi aucun changement.

En ne considérant que le résultat obtenu sur « Loire II » et l'échec sur « Port », on pourrait penser que le caractère Sr initial de la souche, conditionne la transformation. Il semble qu'il n'en soit rien puisque le coli « Phéné » qui était primitivement typiquement S a subi une transformation partielle qui l'a amené à la forme SR.

b) *Culture en milieu additionné de chlorure de calcium.* — Au cours du chapitre précédent, nous avons fait mention des expériences de PLANTUREUX, relatives à l'obtention de bactériophage par action de chlorure de calcium sur des cultures microbiennes pendant une semaine à 37°.

Ayant répété ces expériences, nous avons constaté que l'addition de ce sel aux cultures produit facilement et rapidement, chez certaines d'entre elles, la transformation S—R.

Voici comment nous avons opéré :

Onensemence la souche microbienne dans un tube contenant 5 c.c.³ de bouillon ordinaire stérile. On ajoute 4 gouttes de solution de chlorure de calcium à 2 % (il se produit un trouble qui ne gêne en rien la transformation) et on met à l'étuve. Au bout de 8 jours on pratique l'isolement sur gélose. Le tableau XVI ci-dessus donne les résultats obtenus avec 6 de nos souches.

TABLEAU XVI

NOM de la souche	ASPECT des colonies obtenues	CULTURE en bouillon 24 heures	RÉACTION à la tryptoflavine	RÉACTION de Millon	Forme R, S ou intermédiaire
Laffly (S)	Toute sont plates, irrégulière, surface rugueuse et mate.	Agglutinée	+	+	R
10 (Sr)	Toutes les colonies sont semblables et pareilles à celle de la souche initiale.	Trouble homogène	+	—	Sr
Loire II (Sr)	40 % des colonies sont identiques à celles de la souche initiale.	Trouble homogène	+	—	Sr
	60 % sont plates irrégulières, surface rugueuse et mate.	Agglutinée	+	+	R
1 (Sr)	Toutes les colonies sont semblables et identiques à celles de la souche initiale.	Trouble homogène	+	—	Sr
Th (S)	id.	Trouble homogène	—	—	S
Urinaire (Sr)	90 % des colonies sont identiques à celles de la souche initiale.	Trouble homogène	+	—	Sr
	10 % sont plates, irrégulières surface rugueuse et mate.	Agglutinée	+	+	R

La quantité de solution de chlorure de calcium ajoutée à la culture a une influence sur le taux de la transformation ainsi qu'on peut en juger en notant le % de colonies transformées sous l'influence de quantités croissantes de solution de chlorure de calcium ajoutées à un même volume de culture — les autres conditions restant les mêmes.

TABLEAU XVII

NOM de la souche	Quantité de solution de CaCl_2 à 2 % ajoutée à 5" de culture	% de colonies R obtenues
Laffly	2 gouttes	50
id.	4 gouttes	50
id.	8 gouttes	30
id.	15 gouttes	30
id.	30 gouttes	20

TABLEAU XVIII

NOM de la souche	Quantité de solution de CaCl_2 à 2 % ajoutée à 5" de culture	% de colonies R obtenues
Urinaire	2 gouttes	10
id.	4 gouttes	10
id.	6 gouttes	10
id.	15 gouttes	10
id.	30 gouttes	Aucune

c) *Conclusion.* — L'action du chlorure de calcium, comme d'ailleurs celle des produits de métabolisme ou d'autolyse (vieilles cultures) ne produit la transformation complète en formes rugueuses que sur certaines souches.

D'autres, peuvent prendre une forme intermédiaire par l'aspect nouveau de leurs colonies sur gélose ou par la positivité de la réaction à la trypaflavine. (L'agglutination des cultures en bouillon et la positivité de la réaction de Millon sont deux caractères qui paraissent n'appartenir qu'aux types rugueux véritables.)

Enfin, certaines ne subissent aucune modification. Cette résis-

tance à la transformation en forme rugueuse ne paraît pas en rapport avec le caractère primitif S ou Sr de la souche.

Il nous reste maintenant à étudier le bactériophage dans ses rapports avec la transformation S—R des microbes. Nous allons exposer d'abord ce qui a été publié sur la question.

Nous dirons ensuite comment nous concevons ces rapports et nous émettrons à ce sujet une hypothèse que nous tenterons de vérifier.

DEUXIÈME PARTIE

LA BACTÉRIOPHAGIE DANS SES RAPPORTS AVEC LA TRANSFORMATION SR

A. — TRAVAUX ANTÉRIEURS

EASTWOOD (222) puis HODER (223) ont les premiers remarqué une certaine ressemblance entre la dissociation microbienne ⁽¹⁾ et l'autolyse transmissible.

Le premier de ces auteurs, cherchant un facteur commun à ces deux phénomènes, a souligné qu'ils ne se produisent l'un et l'autre qu'avec des bactéries vivantes.

Plus tard, HADLEY (224), a constaté les faits suivants :

1°) L'autolyse transmissible ne se produit que chez les espèces microbiennes capables de subir la dissociation.

2°) On ne connaît aucune espèce nettement sensible vis-à-vis du bactériophage, qui ne subisse de façon active la transformation S—R dans des conditions favorables.

Il existe, de plus, certaines ressemblances curieuses entre les formes R provenant de la dissociation et certaines cultures secondaires se développant après bactériophagie. BORDET (226), GRIFFITH (225), DE KRUIF (227), REIMANN (204) et AMOSS (228) ont constaté dans les deux cas une agglutination des cultures en bouillon, la perte de la mobilité des cellules microbiennes, l'atténuation des propriétés fermentatives, la modification des propriétés antigéniques et sérologiques, enfin, une plus grande sensibilité à la phagocytose et une virulence généralement plus faible.

Une autre analogie est la suivante : on sait que le phénomène de l'autolyse transmissible s'accompagne de la formation de formes filtrantes ; on les observe lorsqu'on laisse séjourner à l'étuve certains filtrats bactériophagiques. Ceux-ci, primitivement limpides, se troublent peu à peu et l'examen microscopique montre de fins granules qui sont capables de se multiplier et de reprendre l'aspect bacillaire normal par repiquage sur des milieux neufs.

HADLEY (208) a remarqué que les filtrats de certaines cultures subissant la transformation S—R, produisent eux aussi, de façon

(1) Rappelons que cette expression de « dissociation microbienne » est celle utilisée par Hadley pour désigner la transformation S - R. Nous l'emploierons dans le reste de ce travail.

analogue, des formes filtrantes prenant la forme granuleuse et se transformant par repiquages en bactéries normales.

D'autres recherches effectuées par le même auteur en collaboration avec JIMENEZ (229), ont permis à ces savants de produire du bactériophage à partir d'une culture R de bacille paratyphique obtenu par traitement de la souche S correspondant par l'immunsérum homologue.

En résumé, les travaux publiés indiquent : 1°) un rapport entre la sensibilité ou la résistance au bactériophage d'une souche microbienne et la possibilité de lui faire subir la transformation rugueuse ; 2°) des propriétés communes entre les formes R et les cultures secondaires après bactériophagie ; 3°) la formation de formes filtrantes des bactéries par le bactériophage ou par la « dissociation » ; 4°) la possibilité observée par HADLEY et JIMENEZ d'obtenir du bactériophage à partir d'une souche rugueuse de paratyphique B.

B. — TRAVAUX PERSONNELS

a) *Hypothèse émise.*

Ce que l'on sait des rapports entre la bactériophagie et la transformation S—R des microbes — rapports dont nous venons de donner un compte rendu — ; le fait aussi, que les seules expériences qui nous ont permis d'obtenir des bactériophages à partir de souches microbiennes normales, ont abouti parallèlement à la formation de forme R de ces souches ; tout ceci nous a amené à émettre l'hypothèse suivante et à tenter de la vérifier :

Nous nous demandons si les souches microbiennes S ou intermédiaires capables de se transformer en R, ne sont pas porteuses d'un bactériophage inapparent ; si la « dissociation », plaçant ainsi que nous l'avons vu, le microbe dans des conditions qui lui sont défavorables, n'aboutit pas à un nouvel équilibre bactérie-bactériophage dans lequel le bactériophage aurait peut-être une activité plus forte compensée par une résistance plus grande du microbe.

A la faveur de cette modification et par suite, par exemple, d'une défaillance dans la résistance d'une ou de plusieurs cellules microbiennes, du bactériophage pourrait être libéré dans le milieu.

b) *Essais de vérification de cette hypothèse.*

Une telle hypothèse est-elle contraire aux faits et tout d'abord,

de telles souches porteuses de bactériophage existent-elles ?

Nous avons déjà parlé des souches mixtes d'abord décrites par d'HÉRELLE et dont l'existence a été confirmée par d'autres savants. Nous rappellerons seulement qu'elles sont constituées par un équilibre entre la bactérie et le bactériophage, équilibre stable dans les conditions normales.

Si l'on admet l'hypothèse que nous venons d'émettre, il est facile d'expliquer pourquoi la transformation S—R est produite par des moyens aussi divers que ceux que nous avons énumérés (vieilles cultures, produits de métabolisme, immunsérums, certains antiseptiques, etc... ; tous ces moyens, nous l'avons dit, sont nuisibles au microbe mais n'agissent pas sur le bactériophage. Dans ces conditions, il est logique de penser que l'équilibre bactérie-bactériophage de la culture mixte initiale, va être rompu au profit du principe lytique.

Le microbe est dès lors placé dans des conditions telles qu'il devra subir la lyse ou acquérir une résistance plus forte afin de compenser l'effet du bactériophage. Dans le premier cas, il y aura libération de bactériophage dans le milieu ; dans le second, on peut concevoir la création du nouvel équilibre auquel nous faisons allusion et se traduisant par la formation de formes R ou de formes intermédiaires.

Il est un autre fait qui est l'impossibilité de faire subir la transformation rugueuse à certaines souches S qui, nous l'avons vu, sont très résistantes au bactériophage. On peut penser que dans ce cas, quelles que soient les conditions, le bactériophage ne peut arriver à vaincre la résistance du microbe et par conséquent ne peut modifier ses rapports avec ce dernier.

Dans le but de vérifier notre hypothèse, nous avons entrepris 4 séries d'expériences :

1°) Partant d'une souche ultra pure (1), peut-on par les moyens habituels lui faire subir la « dissociation » et la transformer en R ?

2°) Partant d'une souche R, peut-on la transformer en S par les moyens connus pour « ultra purifier » une culture mixte ?

3°) Partant d'une souche S, peut-on la transformer en R par action du bactériophage ?

4°) Est-il possible d'extraire du bactériophage des souches R ?

I. — Essais de « dissociation » d'une culture « ultra pure ».

Nous avons vu que les deux souches de coli « Loire II » et

(1) Rappelons que le qualificatif « ultrapure » appliqué à une souche microbienne, signifie pour d'Hérelle l'absence totale de bactériophage contaminant cette souche.

« urinaire » sont aptes à se transformer en forme rugueuse, l'une par vieillissement en bouillon à la caséine, les deux, par culture en présence de chlorure de calcium.

Si, par application des moyens connus pour l'ultra purification des microbes, nous arrivons à leur faire perdre cette aptitude, nous pourrions penser que le bactériophage que nous avons détruit, était la cause de la modification S—R.

Les méthodes d'« ultrapurification » connues se ramènent à quatre :

a) En faisant une série d'isolements sur gélose on obtient des colonies dont certaines sont « ultrapures » (d'HERELLE [69]).

D'après BRUYNOCHE (230), les cultures mixtes sont d'autant plus faciles à purifier par cette méthode, qu'elles sont plus récentes. Quand la symbiose a été de longue durée, il faut opérer autrement ; par exemple par la méthode suivante :

b) En cultivant le microbe sur un milieu additionné d'un sucre fermentescible. L'acidité, développée dans ces conditions, détruirait le bactériophage sans altérer le microbe.

c) Au lieu de faire produire de l'acide par le microbe aux dépens d'un sucre, on peut aussi effectuer la culture dans un bouillon additionné d'acide à la limite de la tolérance.

d) Enfin, mettant à profit la résistance différente à l'oxydation par le permanganate de potassium, des bactériophages et des microbes, on peut, d'après LOMINSKI (197), arriver à débarrasser des cultures de staphy, coli, subtilis, mégatérium, de toute trace de principe lytique.

Nous avons appliqué ces techniques aux deux souches ci-dessus désignées. Chacune d'elles a été soumise à une série de 8 isolements successifs sur gélose ordinaire. Au dernier isolement, parmi les colonies toutes semblables, quatre ont été prélevées pour chacune des deux souches.

La même expérience de huit isolements successifs a été faite, non plus cette fois sur de la gélose simple, mais sur de la gélose glucosée et là encore, au huitième isolement, nous avons observé des colonies toutes pareilles : parmi elles, quatre provenant de la souche Loire II et autant provenant de la souche Urinaire, ont été prélevées.

La culture en bouillon acidifié a été faite en ajoutant 8 gouttes d'acide chlorhydrique normal stérile à des tubes contenant 10 c.c.³ de bouillon ordinaire. Après 8 passages d'une durée de 24 heures à 37° dans ce milieu, chacune des 2 souches a subi un isolement sur gélose ordinaire et 4 colonies ont été prélevées.

Enfin nous avons répété le mode opératoire de LOMINSKI con-

sistant à ajouter du permanganate de potassium à la dose de 0,4 % à une suspension d'une anse de culture de nos germes dans 10 c.c.³ de bouillon. Nous avons constaté qu'à cette dose — et même à une dose double — le permanganate est instantanément réduit et que sa coloration violette disparaît pour faire place à une coloration brune d'oxyde de manganèse qui reste d'abord en suspension colloïdale grâce à la présence des colloïdes du bouillon. Bientôt d'ailleurs, le colloïde floccule et donne un précipité volumineux.

Il est vraisemblable que dans ces conditions, les cellules microbiennes ne subissent l'action de l'agent oxydant que pendant un temps très court.

Nos souches Loire II et Urinaire ont été traitées de cette façon pendant 24 heures à la température du laboratoire. Nous avons procédé alors à un ensemencement sur gélose et là encore, nous avons prélevé 4 colonies isolées pour chacune des souches.

Toutes les colonies prélevées après les 4 traitements que nous venons de décrire, ont été ensemencées en bouillon de caséine (cas de Loire II) ou en bouillon additionné de chlorure de calcium (cas de Urinaire) et placées dans les conditions déjà décrites pour la transformation S—R.

Dans tous les cas, la transformation s'est réalisée et nous avons pu obtenir des formes rugueuses aussi facilement que nous les avons obtenues en partant de souches non traitées.

Comme on le voit, ce résultat ne paraît pas en faveur de l'hypothèse que nous avons émise. Constitue-t-il un argument contraire ? Nous ne le croyons pas et voici pourquoi :

Nous avons vu au chapitre relatif à l'extraction de bactériophage à partir de souches apparemment non lysogènes, qu'il n'existe actuellement aucun test permettant d'affirmer qu'une souche donnée n'héberge pas un bactériophage. Les méthodes que nous avons exposées paraissent insuffisantes pour « purifier » de façon complète et certaine, une souche microbienne contaminée. D'HÉRELLE le dit d'ailleurs lui-même dans son livre (69), puisque après avoir décrit ses techniques relatives à la préparation des souches « ultrapures », il ajoute en appendice : « Il est pourtant possible que certaines symbioses habituelles bactérie-bactériophage, résistent à tous les traitements. »

LOMINSKI a vu lui aussi que son procédé par oxydation n'est actif que pour purifier des souches expérimentalement contami-

nées mais à condition que le phage soit extra cellulaire ; il est par contre inopérant lorsque le bactériophage comme c'est le cas pour les souches dites cryptolysogènes (1). Pour nous résumer, nous dirons que :

1°) Nous n'avons pas la certitude d'avoir « ultrapurifié » les deux souches qui ont servi à ces expériences ;

2°) Dans ces conditions, le fait d'avoir pu les transformer ensuite en forme rugueuse n'infirme pas l'hypothèse que nous avons émise.

II. — *Essais de transformation d'une souche R en S par les moyens connus pour purifier une souche mixte.*

Les expériences effectuées dans ce but sont calquées sur les précédentes. Nous avons fait :

1°) Une série de 10 passages avec isolement, sur gélose glucosée des formes rugueuses des souches Loire II et Urinaire ;

2°) Une série de 10 passages (24 heures d'étuve à 37°) des mêmes souches dans du bouillon ordinaire acidifié (8 gouttes d'acide chlorhydrique normal pour 10 c.c.³ de bouillon) ;

3°) Traitement pendant 24 heures à la température ordinaire, d'émulsions légères en bouillon, des mêmes souches, par une solution de permanganate de potassium, dans la proportion de 0,4 %.

A la suite de chacun de ces traitements, un repiquage suivi d'isolement sur gélose a été effectué. Dans les trois cas les colonies n'ont subi aucune modification de leur caractère R.

Pour cette expérience comme pour la précédente, un résultat positif aurait été en faveur de l'hypothèse émise ; le résultat négatif obtenu ne permet cependant pas de la rejeter car, là encore, nous n'avons pas la preuve que les traitements auxquels nous avons soumis nos souches « R » ont été suffisants pour les « ultrapurifier ».

Voyons maintenant si la synthèse d'une souche R est possible ; en d'autres termes si l'on peut par fixation de bactériophage sur une souche S, la transformer en R.

III. — *Transformation S—R par le bactériophage.*

Un certain nombre d'auteurs qui ont étudié le phénomène de la bactériophagie sur milieux solides, ont observé que lorsqu'on étale sur gélose une trace de la culture secondaire qui se

(1) Nous rappelons que les souches nommées ainsi par Lominski contiennent du bactériophage qui ne se libère pas au cours de la multiplication du microbe.

développe parfois lorsqu'on conserve un tube de culture lysée par le bactériophage, il se forme généralement des colonies dont quelques-unes ont l'aspect rugueux et irrégulier des colonies R.

On peut aussi, plus simplement, étaler sur gélose, une goutte de la culture microbienne et une goutte de bactériophage. Après incubation, on peut observer des colonies R au milieu d'autres d'aspect S.

Voici le détail des expériences que nous avons effectuées :

Deux tubes de bouillon ordinaire ont été ensemencés avec une culture jeune de « coli urinaire ». Nous ajoutons à l'un d'eux (tube B) 2 gouttes d'un filtrat bactériophage moyennement actif [B coli] ⁽¹⁾ ⁽²⁾. Après 12 heures d'incubation à la température du laboratoire, le tube témoin est trouble tandis que le tube B est limpide. Après 36 heures ce dernier tube se trouble légèrement par suite de la formation d'une culture secondaire. Nous étalons une trace de cette culture sur la gélose d'une boîte de Pétri puis, sans recharger la baguette de verre utilisée à cet effet, sur une autre gélose identique. De cette façon, l'ensemencement de la deuxième boîte est très léger et permet l'obtention de colonies isolées.

Après incubation de 12 heures à la température du laboratoire ⁽³⁾ on voit apparaître de minuscules colonies qui grossissent peu à peu et atteignent une dimension de 2 à 3 mm. après 48 heures.

Toutes les colonies qui se développent dans ces conditions sont d'aspect R, leur culture en bouillon est agglutinée enfin, elles donnent toutes une réaction positive à la trypaflavine et avec le réactif de Millon. Par repiquage sur gélose et incubation à la température du laboratoire, on obtient des colonies présentant tous les caractères « R ». Si l'incubation est faite à l'étuve, on obtient des colonies d'aspect S ⁽¹⁾. Cependant, la culture en bouillon des 2 types de colonies est agglutinée après 24 h. d'étuve et dans les deux cas la réaction de Millon et celle à la trypaflavine sont positives. Nous retrouvons là un désaccord entre l'aspect morphologique et les trois autres caractères qui définissent les types R.

(1) Un filtrat très actif donnerait une lyse définitive.

(2) Afin d'éviter toute confusion, les bactériophages utilisés dans les expériences qui suivent, seront désignés par la lettre B précédant le nom ou les initiales que nous leur avons donnés, le tout entre parenthèses.

(3) Une expérience préliminaire nous a montré que les formes « R » apparaissent plus facilement à la température du laboratoire qu'à 37°.

(1) Nous avons aussi remarqué que « l'aspect » rugueux des colonies s'atténue au cours du vieillissement de la culture.

Parmi les colonies qui se sont développées sur notre plaque de gélose, quatre d'entre elles méritent une attention particulière : bien que de diamètre sensiblement égal aux autres, elles sont encore plus plates et d'aspect plus vitreux que les colonies R habituelles. Alors que le repiquage sur gélose ou en bouillon des autres colonies donne une culture bien développée, celles-ci ne consentent à pousser dans aucun de ces deux milieux.

Une petite quantité de la substance microbienne constituant ces colonies, émulsionnée dans du bouillon qui est ensuite filtré, donne un liquide capable de provoquer d'emblée la lyse du *Coli* « urinaire ».

L'examen microscopique montre des débris mal colorés, au milieu de formes bacillaires gonflées. Cet aspect des cellules et la présence du bactériophage dans la masse microbienne, indiquent que ces colonies ont subi une lyse bactériophagique après s'être développées, ou au fur et à mesure de leur développement.

Il est intéressant de noter le parallélisme entre l'aspect « R » particulièrement accentué de ces colonies et la présence de principe lytique et il est permis de se demander si dans ce cas, l'équilibre bactérie-bactériophage, auquel nous faisons allusion dans notre hypothèse, ne s'est pas ici déplacé à l'excès au profit du bactériophage qui est dès lors devenu assez actif pour produire la lyse (ou le gonflement qui la précède), de toutes les cellules constituant la colonie microbienne.

Si nous observons notre boîte de Pétri après une nouvelle incubation de 24 heures à la température du laboratoire, nous constatons que ce ne sont plus quatre, mais toutes les colonies qui ont pris l'aspect très plat et vitreux que nous avons signalé ci-dessus. On observe en outre à la surface de quelques-unes de ces colonies, l'apparition de très petites colonies muqueuses qui se développent abondamment dans les jours qui suivent.

Comme nous le disions plus haut, l'expérience peut être réalisée aussi en étalant sur gélose une petite quantité d'un mélange de culture microbienne et de bactériophage. Pour cela, dans un tube à essais stérile, on mélange 1 c.c.³ d'une culture microbienne de 24 h. en bouillon et 1 c.c.³ de filtrat bactériophage. Une anse (0 c.c.³ 025) du mélange est alors déposée sur la gélose d'une boîte de Pétri et étalée au moyen d'une fine tige de verre coudée. Après incubation de 48 h. à 20°, on observe les cultures.

Nous avons effectué cette expérience d'abord avec la souche « urinaire » et le bactériophage (*B. Coli*). Les résultats se sont montrés identiques à ceux observés au moyen de la technique

précédente, c'est-à-dire que toutes les colonies qui se sont formées étaient « R ».

Avec la souche « val II » et le bactériophage (B. Th), l'aspect des colonies qui se forment est un peu différent : 5 d'entre elles sont de forme très irrégulière et très plates ; ces deux caractères étant beaucoup plus accentués que sur les colonies R obtenues avec le coli « urinaire » et le (B. coli). Elles sont mates, paraissent opaques lorsqu'on les examine devant une source lumineuse, leur culture en bouillon est entièrement agglutinée après 24 heures à 37°, enfin, elles donnent une réaction à la trypaflavine et une réaction de Millon fortement positive ; en somme, tous les caractères R.

Il se forme aussi dans ces conditions, de petites colonies irrégulières (50 environ) très plates, opaques, à surface mate, non repiquables, constituées par des microbes en partie lysés. Ces petites colonies sont en tous points semblables à celles que nous avons obtenues au cours de l'expérience précédente.

Enfin, on observe des colonies rondes, bombées, luisantes (16 dans notre expérience), ayant l'aspect typiquement lisse mais agglutinant fortement à la trypaflavine et au Millon ⁽¹⁾.

Les colonies décrites ci-dessus sont-elles stables ? Pour le vérifier, nous en avons prélevé 3 rugueuses et 3 d'aspect lisse. Chacune d'elles a subi 20 repiquages avec isolements sur gélose.

Dans une première expérience, l'incubation après chaque repiquage a été faite à 20° et a duré 48 heures. Les cultures obtenues à partir des 3 colonies rugueuses ont conservé dans ces conditions la totalité de leurs caractères R. Par contre, les cultures faites à partir des 3 autres colonies (d'aspect S) ont donné des formes d'aspect R ou intermédiaire : sR ou Sr. Les réactions à la trypaflavine et au Millon se sont maintenues positives.

Si l'incubation est faite à 37°, les choses se passent autrement : les colonies R conservent bien leurs 3 caractères d'agglutination mais perdent leur aspect caractéristique pour prendre celui de la forme S. Cette modification n'est que temporaire et n'est due qu'aux conditions de température car si l'on retire de l'étuve une telle culture après 24 heures et qu'on laisse l'incubation se poursuivre à 20°, on constate le développement, à la périphérie

(1) On sait que la positivité de ces deux réactions est liée à une modification de la surface des cellules microbiennes. Il est intéressant de souligner cette action du bactériophage sur la partie superficielle des germes. Une étude antigénique mériterait d'être faite et elle établirait si, comme cela se produit chez les types d'aspect rugueux, il y a ou non perte de l'antigène H et peut-être de l'antigène O.

des colonies lisses et bombées, d'une culture plate dont la surface est rugueuse.

★★

La conclusion de ces expériences est donc la suivante : par action d'une suspension de bactériophages d'activité moyenne sur 2 souches de *B. coli* sensible lisse, il nous a été possible de préparer des formes rugueuses de ces microbes présentant les caractères que nous avons défini : aspect rugueux, agglutination avec les 2 réactifs Millon et trypaflavine, culture agglutinative en bouillon ⁽¹⁾. Toutefois, le premier de ces caractères ne se manifeste dans certains cas que par culture à la température ordinaire ⁽²⁾.

★★

Une question se pose maintenant : cette production de formes rugueuses est-elle le résultat d'une synthèse véritable ou ne s'agit-il pas d'une sélection, sous l'influence du bactériophage, de germes résistant à son action et se trouvant préalablement dans la culture : BURNET (250) admet plutôt cette deuxième façon de voir ; c'est également l'opinion de GRATIA qui a fondé son opinion sur l'expérience suivante :

On prépare des boîtes de Pétri contenant de la gélose, sur lesquelles on étale 5 gouttes de bactériophage soit, non dilué, soit dilué. On étend ensuite une goutte d'une suspension microbienne à 11 milliards par centimètre cube et, sur une autre série, une goutte d'une suspension à 1,1 milliard. Après incubation, on compte le nombre de colonies lisses et rugueuses. On trouve : *a*) que le nombre de colonies de la phase opposée (rugueuse) est proportionnel au nombre des bactéries soumises à la lyse et indépendant de la concentration du bactériophage ; *b*) que le même nombre de types résistants de phase rugueuse est produit par des phages d'origine différente.

Citons aussi l'opinion de ARKWRIGHT (251), qui interprète plutôt la formation de variantes rugueuses sous l'action du bactériophage, comme la stimulation d'un processus normal. On se rappelle que le vieillissement des cultures agirait de manière analogue.

Si l'explication émise par GRATIA et BURNET est exacte ; autrement dit, si le bactériophage exerce sur les germes soumis à son

(1) Ce caractère n'est que partiel avec certaines des colonies étudiées.

(2) Au cours de notre étude sur les formes R obtenues par d'autres moyens que par le bactériophage, nous avons déjà signalé l'influence de la température d'incubation sur l'esprit rugueux.

action une sélection permettant seulement le développement de ceux à caractères rugueux, on doit pouvoir vérifier les faits suivants :

1°) L'action d'une quantité donnée d'un bactériophage, agissant sur une quantité donnée de microbes, doit conduire au même nombre de colonies rugueuses que l'incubation se fasse à 20° ou à 37°.

2°) Tous les germes constituant les colonies rugueuses doivent être résistants au bactériophage qui a permis leur sélection.

3°) Deux races de bactériophages étant actives sur un même microbe lisse, une même quantité de la culture du microbe étalée sur gélose avec l'un ou l'autre de ces bactériophages, doit conduire au même nombre de colonies rugueuses.

4°) Pour une même quantité de bactériophage, le nombre de colonies rugueuses obtenu doit être proportionnel au nombre de microbes mis en jeu (1).

5°) Le nombre des colonies rugueuses obtenues par action d'un même bactériophage à différents degrés d'activité, sur une même quantité d'un même microbe, doit être indépendant de cette activité du principe lytique.

6°) Le vieillissement des cultures microbiennes S favorisant la formation de formes rugueuses, des cultures lisses datant de plusieurs jours, doivent donner davantage de colonies R que des cultures jeunes du même microbe — à nombre de germes vivants égal — lorsqu'on les soumet à l'action d'un même bactériophage.

Dans le but de vérifier la première proposition, nous avons fait l'expérience suivante :

Un tube de bouillon est inoculé avec une souche sensible lisse : Coli « urinaire » jusqu'à trouble très léger. On ajoute une trace de bactériophage actif seulement sur la forme lisse de cette souche ; on laisse incubé à 20°, c'est-à-dire à une température favorable à la bactériophagie. Le milieu se clarifie et il ne se produit aucune culture secondaire ; le liquide reste limpide pendant les semaines qui suivent. Si des germes rugueux existaient dans la culture ils auraient dû se développer puisque notre bactériophage n'agit pas sur eux. Or, il n'en a rien été.

Si maintenant, au lieu de laisser l'incubation s'effectuer à 20° nous la laissons se faire à 37° ou mieux à 40°, une culture secondaire ne tarde pas à apparaître après la lyse, dont une trace, étalée sur gélose, donne le développement de colonies d'aspect lisse et de quelques colonies rugueuses. Les premières donnent

(1) Nous avons vu que c'est en effectuant les expériences 3) et 4) que Gratia a établi son opinion. Nous désirons reprendre ces expériences.

une réaction positive aux réactifs trypaflavine et Millon et agglutinent partiellement par culture en bouillon. Par repiquage sur gélose et incubation à 20° on observe des formes R et des formes intermédiaires entre R et S ainsi donc, suivant les conditions de l'expérience (incubation à l'étuve ou à 20°), on obtient ou non des colonies rugueuses par action du bactériophage sur une même quantité de microbes lisses.

Cette expérience ne paraît pas favorable à l'hypothèse d'une sélection ; car alors, quelle que soit la température d'incubation, les germes rugueux devraient également se développer. Il semble qu'on puisse plutôt l'interpréter de la façon suivante : à 20°, les conditions étaient trop favorables au bactériophage employé pour qu'un équilibre bactérie-bactériophage aboutissant à une culture mixte puisse s'établir. A 37°, par contre, le microbe s'est trouvé dans de meilleures conditions par rapport à celles du bactériophage ; l'équilibre a pu s'établir.

Une autre expérience faite en étalant respectivement sur deux boîtes de Pétri garnies de gélose, à la fois une goutte de culture de 24 heures de coli — cette fois « val 2 » — et de bactériophage (B. Th) et en faisant incuber l'une des boîtes à 37°, l'autre à 20°, nous a donné, dans le premier cas, une nappe microbienne uniforme et dans le second 54 colonies rugueuses. Ce résultat confirme le précédent.

2°) Afin de vérifier si les germes constituant les colonies rugueuses sont résistants au bactériophage, nous avons cultivé 6 de ces colonies obtenues précédemment par l'action de (B. Th) sur Coli « Val 2 » et nous avons essayé l'action de (B. Th.) en bouillon et sur gélose suivant la technique habituelle déjà décrite dans ce travail.

Nous avons pu constater qu'en effet ces microbes sont résistants. Ce fait paraît apporter un argument en faveur de la théorie de la sélection ; cependant, il nous faut remarquer qu'il ne va pas à l'encontre de l'hypothèse que nous cherchons à contrôler. Si en effet, dans ces cultures rugueuses, le microbe constitue une culture mixte avec le bactériophage, il faut bien qu'il résiste à son action, sinon l'équilibre serait rompu et la lyse se produirait.

3°) Voyons maintenant l'action de 2 bactériophages différents sur une même quantité d'un même microbe et si les colonies rugueuses obtenues sont en nombre égal dans les deux cas.

Pour cela, étalons sur une gélose contenue dans une boîte de Pétri, à la fois une goutte d'une culture de 24 heures de Coli « Val 2 » et de bactériophage (B. Th). Répétons la même expé-

rience sur une autre boîte en étalant une goutte de la même culture du Coli « Val 2 » avec une goutte d'un autre bactériophage (B. Rh) qui agit également sur lui. Laissons l'incubation se produire à 20°. Après 48 heures, nous constatons dans le premier cas qu'il s'est formé :

45 colonies ayant tous les caractères « R » ;

10 colonies lissés en forme de cône très aplati, à sommet arrondi et à base légèrement irrégulière. Les germes constituant ces colonies, malgré leur caractère lisse, présentent pourtant les trois autres caractères connus pour les souches rugueuses.

Par l'action de (B. Rh) sur le même coli, nous n'avons obtenu que 25 colonies nettement R d'emblée et 10 colonies correspondant comme aspect à celui des colonies lisses obtenues par l'action de (B. Th) — à cette seule différence que leur surface au lieu d'être lisse et luisante est ici rugueuse et luisante. Les autres caractères sont ceux des germes rugueux.

Une nouvelle expérience conduite dans des conditions identiques a été faite avec la souche coli « urinaire » et les bactériophages (B. coli), (B. Pu) et (B. Pt), (B. Rh), et une autre avec coli 1 et les mêmes bactériophages. Les tableaux ci-dessous donnent des résultats obtenus.

Coli « urinaire » + (B. coli)	— 6 colonies ayant tous les caractères « R » et repiquable. — 20 petites colonies muqueuses (1). — Environ 25 très petites colonies plates, irrégulières, rugueuses et mates, non repiquables.
Coli « urinaire » + (B. Pu)	— 25 colonies irrégulières, plates, rugueuses, dont la partie centrale est surmontée d'une calotte muqueuse (2). — 80 colonies irrégulières, plates, rugueuses, de dimensions inégales, certaines sont repiquables, d'autres non. — 70 colonies muqueuses.
Coli « urinaire » + (B. Pt)	— 12 colonies irrégulières, plates, rugueuses, dont la partie centrale est surmontée d'une calotte muqueuse. — 3 colonies « R » très mates, non repiquables. — 1 colonie muqueuse.
Coli « urinaire » + (B. Rh)	— 3 colonies irrégulières, plates, rugueuses dont la partie centrale est surmontée d'une calotte muqueuse. — 5 colonies « R » opaques, très mates, non repiquables. — 7 colonies muqueuses.

(1) Rappelons que les colonies muqueuses obtenues dans ces conditions, agglutinent fortement par le réactif à la tryptoflavine et par le réactif de Million. Ces colonies sont lysogènes. On remarquera la tendance à donner de telles colonies que possède notre souche « urinaire ».

(2) Cette calotte muqueuse donne l'impression d'une petite colonie muqueuse qui se serait développée aux dépens de la substance de la colonie « R » qui la supporte. Aspect comparable à celui des « colonies filles » qui se développent parfois sur certaines colonies dans des vieilles cultures.

Coli 1 + (B. coli)	— 4 petites colonies "R" très opaques. — 2 colonies muqueuses.
Coli 1 + (B. Pu)	— 7 petites colonies "R" presque entièrement recouvertes d'une calotte muqueuse. — 25 petites colonies "R" très mates non repiquables. — 22 petites colonies muqueuses.
Coli 1 + (B. Pt)	— 17 colonies "R" recouvertes d'une calotte muqueuse. — 3 colonies muqueuses. — 8 petites colonies "R" très mates, non repiquables.
Coli 1 + (B. Rh)	— 8 très petites colonies très mates, non repiquables. — 3 colonies muqueuses.

On voit d'après les résultats ci-dessus que le nombre de germes R qui se sont manifestés par l'apparition d'une colonie sur gélose est différent pour chaque souche suivant le bactériophage employé.

Une sélection éliminant seulement les formes lisses aurait dû donner dans les deux cas le même nombre de colonies R. Au contraire, si l'on admet que les colonies R sont constituées par une culture mixte bactérie-bactériophage, on conçoit que leur formation dépende du principe lytique employé et de ses facultés agressives vis-à-vis du microbe, dans les conditions de l'expérience.

Ainsi, on peut expliquer plus aisément la variation du nombre de colonies qui ont pu se former sur nos plaques de gélose suivant le bactériophage employé.

4°) Nous allons maintenant voir si, sous l'action d'une même quantité de bactériophage, le nombre de germes donnant naissance à une colonie rugueuse, est proportionnel ou non au nombre de microbes mis en œuvre.

Pour cela, nous avons effectué l'expérience suivante :

Quatre tubes à essais stériles ont reçu chacun 1 c.c.³ de bactériophage (B. Th). Nous avons ajouté respectivement à ces tubes : 1 c.c.³, 2 c.c.³, 3 c.c.³, 4 c.c.³ de culture microbienne de 24 heures en bouillon de coli « val II » puis nous avons complété le volume des trois premiers à 5 c.c.³ par addition de 3 c.c.³, 2 c.c.³ et 1 c.c.³ de bouillon ordinaire.

Une goutte normale du contenu de chacun de ces tubes a été étalée sur gélose et l'incubation a été faite à 20°. Le tableau ci-dessous donne les résultats.

COLI " VAL 2 " + (B. Th)				
Aspect des colonies obtenues	1 cc. bactériophage 1 cc. microbe 3 cc. bouillon	1 cc. bactériophage 2 cc. microbe 2 cc. bouillon	1 cc. bactériophage 3 cc. microbe 1 cc. bouillon	1 cc. bactériophage 4 cc. microbe
Colonies irrégulières, surface rugueuse.	0	0	5	0
Colonies très irrégulières, surface très plate, mate, rugueuse.	4	12	48	35
Très petites colonies irrégulières, très plates, très mates, non repiquables.	50	40	25	35
Colonies rondes, bombées, luisantes	30	28	35	42

La même expérience a été faite avec le coli « Val 2 » et le bactériophage « B. Rh ». Le tableau ci-dessous donne les résultats.

COLI " VAL 2 " + (B. Rh)				
Aspect des colonies obtenues	1 cc ³ bactériophage 1 cc ³ microbe 3 cc ³ bouillon	1 cc ³ bactériophage 2 cc ³ microbe 2 cc ³ bouillon	1 cc. bactériophage 3 cc. microbe 1 cc. bouillon	1 cc. bactériophage 4 cc. microbe
Colonies irrégulières, surface rugueuse.	1	1	1	3
Colonies très irrégulières, surface très plate, mate, rugueuse.	20	14	52	46
Très petites colonies, irrégulières, très plates, très mates, non repiquables.	35	32	25	28
Colonies rondes, bombées, luisantes.	46	55	87	89

Comme on le voit d'après les chiffres indiqués par ces tableaux, il y a une augmentation très nette du nombre des colonies lorsque croît la quantité de microbes ajoutée au bactériophage ; mais il n'y a pas proportionnalité.

Ce résultat se concilie difficilement avec l'hypothèse de la sélection ; il s'explique mieux, croyons-nous, par celle que nous avons émise. La formation d'une culture mixte n'est plus une fonction linéaire dépendant seulement du nombre de microbes ; beaucoup d'autres facteurs interviennent pour rendre le phéno-

mène plus complexe et modifier les rapports bactérie-bactériophage. En dehors des conditions de milieu (épaisseur, concentration en gélose) et des conditions physiques et chimiques (pH, aération, etc...) que nous ne faisons que mentionner, car elles n'interviennent ici que dans la mesure où elles sont modifiées par la culture microbienne, c'est-à-dire très peu, — d'autres conditions d'ordre biologique et spécialement les produits de la lyse, peuvent intervenir et agir sur les facteurs qui règlent la formation de la culture mixte : la résistance que la bactérie peut acquérir et l'activité du bactériophage.

5°) Il nous a paru intéressant de rechercher si les formes rugueuses obtenues dans les conditions déjà décrites, varient dans leur nombre avec l'activité du bactériophage qui a provoqué leur formation.

Pour cela, nous nous sommes servis du coli « urinaire » et du bactériophage (B. Pu). Ce bactériophage est assez actif pour provoquer la lyse complète, en bouillon, d'une émulsion du microbe contenant environ 300 millions de germes par c.c.³. Cependant, au bout de cinq jours de conservation à la température du laboratoire, une culture secondaire apparaît.

L'étalement sur gélose d'une goutte de culture de 24 heures du microbe et d'une goutte du bactériophage, donne après incubation à 20° les résultats suivants :

25 colonies irrégulières, plates, rugueuses dont la partie centrale est surmontée d'une calotte muqueuse.

80 colonies irrégulières, plates, rugueuses, de dimensions inégales, certaines sont repiquables, d'autres non.

70 colonies muqueuses.

Afin d'augmenter l'activité du bactériophage (B. Pu) vis-à-vis du coli « urinaire », nous lui avons fait subir 10 passages sur ce microbe (1) puis, comme dans l'expérience précédente, nous en avons étalé sur gélose une goutte, en même temps qu'une goutte de culture de 24 heures du B. coli « urinaire ». Cette fois, nous avons obtenu les résultats suivants :

6 colonies irrégulières plates, rugueuses.

12 très petites colonies plates, rugueuses, très mates.

3 colonies muqueuses d'abord très petites mais qui se sont progressivement étalées.

Comme on le voit, l'action d'un bactériophage plus actif a amené, dans les conditions de nos expériences, une diminution

(1) Le bactériophage ainsi obtenu agit plus efficacement sur le microbe car, cette fois, aucune culture secondaire n'apparaît dans le lysat au bout d'un délai de 1 mois.

du nombre des formes rugueuses obtenues. Or, le bactériophage (B. Pu) avant comme après les passages, n'agit pas sur les cultures rugueuses du coli « urinaire » que nous avons préparées antérieurement par l'action du chlorure de calcium sur les cultures lisses de ce microbe. Il est difficile d'expliquer les résultats de l'expérience ci-dessus par l'hypothèse de la sélection. On conçoit mieux l'explication suivant laquelle les formes rugueuses résulteraient d'un équilibre bactérie-bactériophage ; cet équilibre dépend forcément de l'activité du bactériophage.

6°) Pour finir, nous donnerons un dernier argument expérimental entre l'hypothèse de la sélection. Si en effet, celle-ci est exacte, les formes rugueuses obtenues par l'action d'un même filtrat bactériophage sur deux cultures d'âge différent d'un même microbe (à nombre de germes vivants égal), doivent être plus nombreuses avec la culture la plus âgée, puisque l'on sait que le vieillissement favorise la formation de ces formes rugueuses.

Nous avons expérimenté au moyen de cultures en bouillon du coli « urinaire », âgées respectivement de 24 heures et de 120 heures ; ces cultures ayant été faites à la température de 20°. Nous avons déterminé le nombre de microbes vivants contenu dans 1 c.c.³ de chaque culture en utilisant la méthode de numération par dilution et ensemencement sur gélose. Nous nous sommes inspiré pour cela du travail d'Alice KAPLAN (Thèse Pharmacie, Paris 1931), qui donne une parfaite mise au point de la technique. Quelques centimètres cubes de chacune des cultures en bouillon ont été transportés aseptiquement dans 2 tubes à essais résistants en verre Pyrex, contenant des billes de verre et préalablement stérilisés. Une agitation de quelques minutes a permis d'obtenir l'homogénéisation des cultures qui ont alors subi d'abord 3 dilutions au centième, dans des ballons contenant 99 grammes de sérum physiologique, puis 3 dilutions au 1/10 dans des tubes contenant 9 c.c.³ du même sérum. On a alors prélevé 1 c.c.³ de la dernière et de l'avant-dernière dilution et on les a respectivement ajoutés à 20 c.c.³ de gélose fondue, amenée à la température de 45°. Ces géloses ont ensuite été coulées dans des boîtes de Pétri stériles. Après incubation de 16 heures à 37° (1), nous avons compté les colonies et un calcul simple nous a permis de déterminer le titre en microbes vivants de chacune des cultures.

Résultats :

8.800.000.000 de germes vivants p. la cult. de 120 heures.

3.800.000.000 de germes vivants p. la cult. de 24 heures.

(1) Le nombre des colonies n'avait pas augmenté après 72 h. d'étuve.

Pendant cette expérience préliminaire, nous avons maintenu nos 2 cultures à la glacière; dès que nous avons été en possession des résultats ci-dessus, nous avons effectué une dilution convenable de la culture la plus riche de façon à l'amener à contenir le même nombre de microbes vivants que l'autre.

Sur une boîte de Pétri renfermant de la gélose, nous avons étalé sur l'une des moitiés: une goutte ⁽¹⁾ du bactériophage (B. Pu) et une goutte de la culture de 24 heures; sur l'autre moitié nous avons fait un étalement semblable en utilisant la culture de 120 heures; nous avons ensuite laissé l'incubation se poursuivre à la température ordinaire pendant 48 heures et nous avons noté les résultats suivants:

Culture de 24 heures:

165 colonies toutes rugueuses mais plus ou moins irrégulières et plus ou moins aplaties.

Culture de 120 heures:

50 colonies semblables aux précédentes.

Contrairement à ce qu'on aurait pu prévoir en admettant l'hypothèse de la sélection, c'est la culture la plus jeune qui a donné le plus grand nombre de formes rugueuses.

Si ces dernières formes résultent, comme nous cherchons à le vérifier, de l'union du phage et du microbe, il faut admettre que le microbe se trouve dans des conditions plus favorables lorsqu'il est jeune que lorsqu'il est âgé. Il n'y a rien de surprenant à ce qu'une telle union soit liée à l'état biologique du germe comme elle est liée à celui du principe lytique.

★★

L'opinion suivant laquelle les formes R préexisteraient dans les cultures microbiennes normales et suivant laquelle le bactériophage libérerait ces formes par un processus de sélection, ne nous paraît pas conciliable avec les faits expérimentaux ci-dessus. Il nous semble que ceux-ci s'expliquent mieux par l'hypothèse que nous avons émise et d'après laquelle les formes R correspondraient à une association mixte bactérie-bactériophage.

Si cette dernière hypothèse est exacte, il est peut-être possible, par certains artifices, de produire du bactériophage à partir de formes microbiennes R. C'est de cette question que nous allons parler maintenant.

(1) Nous disposons pour ces expériences de pipettes donnant des gouttes normales.

IV. — *Essais d'obtention de bactériophage à partir des souches « R ».*

Nous avons déjà cité le mémoire de HADLEY et JIMENEZ (229), dans lequel ces auteurs exposent qu'ils sont parvenus à mettre en évidence du bactériophage dans la culture en bouillon de la forme R d'une souche de bacille paratyphique A.

Voyons ici plus en détail comment ont opéré ces auteurs :

Le point de départ de leurs expériences est une souche de type S dont les colonies sur gélose sont bien rondes et bien régulières et dont la surface est lisse et luisante. Cette souche, conservée au laboratoire depuis plusieurs années n'avait jamais présenté de manifestation lytique et une série d'isolements effectués par les auteurs, leur ont montré qu'elle ne contenait aucune autre forme microbienne que celle dont les colonies viennent d'être décrites.

Un vaccin préparé au moyen de ces germes, a été inoculé au lapin et a permis d'obtenir un immunsérum qui a servi lui-même à la préparation de la forme R de la souche en question.

Pour cela, HADLEY et son collaborateur ont préparé un bouillon renfermant 1/10 de son volume du sérum et ils ont effectué des cultures de leurs souches dans ce milieu. Après six passages, ils ont pu constater par un isolement sur gélose que la transformation en forme R avait été complète.

Les colonies R ainsi obtenues,ensemencées en bouillon ordinaire pH 7,8 et placées une nuit à l'étuve ont donné une culture dont le filtrat a manifesté des propriétés lytiques après trois passages sur une souche microbienne sensible de même espèce.

On peut objecter — et les auteurs le font remarquer eux-mêmes — que l'immunsérum pouvait contenir du bactériophage et que c'est celui-ci qui a été mis en évidence.

Mais nous avons vu qu'il est également possible d'obtenir la transformation S—R d'une souche microbienne par vieillissement de sa culture en bouillon. Si, à partir d'une colonie R ainsi obtenue, on peut obtenir des cultures dont les filtrats renferment du principe lytique, c'est bien que celui-ci provient des microbes eux-mêmes (1).

Signalons aussi un travail de PLANTUREUX (231) dans lequel cet auteur, cherchant à mettre en parallèle le bactériophage et les anticorps, est parvenu lui aussi à constater une activité de

(1) Nous avons vu au cours de l'introduction que Hadley considère le bactériophage comme l'un des aspects de la « dissociation microbienne » et qu'il est probablement lié à un mécanisme reproductif pseudolytique dont la nature est inconnue.

nature bactériophagique dans le filtrat d'une culture de 20 jours d'un bacille de Shiga, préparée à partir de colonies isolées d'une culture faite en bouillon sérum. Bien que l'auteur ne le précise pas, il s'agit sans doute ici, encore de la forme R du microbe.

Il nous faut remarquer dès maintenant que l'expérience de HADLEY et JIMENEZ, de même que celle de PLANTUREUX, ne portent chacune que sur une seule souche microbienne, de paratyphique A pour les premiers et de SHIGA pour le second. Ces auteurs ne disent malheureusement pas s'ils ont obtenu un résultat analogue en employant d'autres souches.

★★

Nous avons répété l'expérience de HADLEY en employant trois de nos souches R : Loire II, Urinaire et Laffly, dont la première a été obtenue par vieillissement de cultures de la forme S correspondante et les deux autres par culture en bouillon calcifié.

Des cultures en bouillon ordinaire, pH 7,8, de chacune de ces souches obtenues après un séjour d'une nuit à l'étuve, ont été filtrées et essayées sur bouillon et sur gélose sur notre coli sensible Urinaire et sur les autres souches : I, 10, val II. Aucune lyse ni aucune plage n'ont pu être observées même après 8 passages sur chacune de ces souches.

D'autres essais ont été effectués en utilisant des filtrats de culture R plus âgés : 24 h., 48 h., 5 jours, 10 jours, 20 jours. Là encore, nous n'avons pu observer aucun phénomène de lyse.

Nous avons fait un certain nombre d'autres expériences dans le but de mettre en liberté du bactériophage à partir des formes R de coli. Nous les décrivons sans trop nous y attarder car elles ne nous ont donné aucun résultat.

Voici l'exposé de ces expériences et les raisons qui nous ont incité à les entreprendre :

1°) On sait que les conditions de vie des microbes sur gélose sont différentes de celles en bouillon. En particulier, l'oxygénation est plus grande et le contact avec les produits de métabolisme est moins grand car ceux-ci diffusent dans la masse de la gélose.

Or, on sait aussi que l'oxygénation favorise la bactériophagie et que les produits du métabolisme microbien l'inhibent.

Dans ces conditions, il est permis de penser que si du bactériophage se trouve dans les formes R, il se trouvera favorisé et peut être arrivera-t-il à vaincre la résistance de quelques cellules microbiennes et à se libérer dans la masse de la culture.

Nous avons donc préparé des cultures R sur gélose et au bout de temps variables : 12 h., 48 h., 72 h., 5 jours, 10 jours, 20 jours et 30 jours, nous avons prélevé un peu de la substance microbienne qui a été émulsionnée dans du bouillon. Après une vive agitation on a filtré sur bougie et le bactériophage a été recherché dans le filtrat. Cette expérience faite en utilisant les 3 souches R, Loire II, Urinaire et Laffly, n'a donné aucun résultat malgré de nombreux passages.

2°) L'expérience ci-dessus a été faite en utilisant des cultures incubées à 37° ; une température plus basse étant plus favorable au bactériophage, nous avons jugé utile de la répéter avec des cultures faites à la température du laboratoire. Le résultat a été également négatif.

3°) Un autre essai a été fait dans le but de supprimer complètement la présence des produits de métabolisme capables d'inhiber le bactériophage éventuellement libéré dans la culture.

Nous avons reproduit pour cela les expériences faites par FUKUDA et décrites au chapitre IV, mais en utilisant cette fois des souches R de coli.

Rappelons que ces expériences consistent à centrifuger la culture en bouillon, après une incubation de 24 heures, à enlever ensuite le bouillon clair surmontant le culot microbien et à le remplacer par la même quantité de bouillon neuf que l'on ensemence avec une anse de culture jeune du même microbe. Après une nouvelle incubation de 24 heures à 37°, on centrifuge de nouveau et on répète 10 fois le même traitement : La recherche du bactériophage dans les liquides centrifugés s'est montrée négative.

4°) Les bactériophages éventuellement libérés dans les cultures microbiennes R sont peut-être immédiatement fixés par adsorption sur des colloïdes microbiens se trouvant dans le milieu, ou sur les microbes eux-mêmes. Peut-être alors l'élution par des solutions phosphatées alcalines serait-elle capable de les détacher de leur support.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons préparé des cultures d'âge différent : 24 heures, 3 jours, 8 jours, 15 jours, des 3 souches R qui nous ont déjà servi pour nos essais précédents, et nous y avons ajouté 1/10 de leur volume de solution de phosphate isodique à 10 %. Après agitation et contact de 15 minutes, nous avons filtré sur bougie L₃ et amené le filtrat à pH 7,8 par addition de quelques gouttes de phosphate monosodique à 10 %.

La recherche de bactériophage dans ce filtrat n'a donné aucun résultat.

5°) FLU a annoncé en 1923 (232) qu'il avait pu extraire le bactériophage contenu dans une culture mixte naturelle et ceci de la façon suivante : d'abord, préparation d'une culture jeune de la bactérie, puis centrifugation, séparation des corps microbiens, broyage prolongé de ces corps microbiens au mortier en présence de sulfate de soude anhydre, reprise par l'eau et filtration sur bougie. Le liquide obtenu de cette façon contenait du principe lytique.

Il était intéressant de répéter cette expérience sur des souches R. Nous l'avons fait mais nous n'avons pu obtenir le résultat observé par FLU sur sa souche mixte.

On peut penser que dans cette dernière, le bactériophage était fixé moins solidement et a pu se détacher par le traitement de broyage.

6°) Nous avons déjà signalé au cours de ce travail les expériences de LOMINSKI (233) suivant lesquelles certaines souches dites cryptolysogènes, renferment du bactériophage ne se manifestant apparemment pas mais qu'on peut mettre en évidence par culture du microbe dans des conditions dysgoniques.

L'auteur ne donne malheureusement pas de précisions sur ces conditions ; il se contente de dire qu'elles consistent à faire vivre le microbe sur un milieu solide pauvre ou à un pH et à une température inadéquates ou par espacement des repiquages.

Les résultats sont positifs dans 70 % des cas.

Nous avons voulu voir si de telles conditions de vie permettaient de libérer du bactériophage à partir de nos souches R.

Nous avons pour cela effectué une série de 8 repiquages espacés de quinze jours, sur de la gélose inclinée préparée au moyen d'un bouillon peptoné à 20 %. Après chaque repiquage, la culture mère était émulsionnée dans du bouillon et filtrée sur bougie. La recherche du bactériophage effectuée dans ces filtrats fut constamment négative.

Même résultat négatif par culture et repiquage sur gélose salée à 5 %, sur milieux solides alcalinisés par des quantités croissantes de soude normale stérile, ou par incubation à 42° de cultures ensemencées en bouillon ordinaire ou sur gélose ordinaire.

7°) Dans toutes les expériences décrites ci-dessus, la recherche du bactériophage a été faite en utilisant comme souche détectrice la souche de coli « Urinaire » qui est la plus sensible de notre collection. Peut-être les échecs que nous avons enregistrés sont-ils dus au fait que cette souche n'est pas suffisamment sensible pour détecter les principes lysiques sans doute très faibles qui pouvaient être libérés par traitement de nos souches R.

Nous avons donc entrepris la recherche de nouvelles souches détectrices.

Il semble admis que la résistance des microbes au bactériophage est due à la membrane ; nous avons donc pensé que les bacilles coli extraits des eaux de rivière, bacilles qui ont subi un lavage par de grandes quantités d'eau, pouvaient avoir perdu la résistance et constituer d'excellents détecteurs.

Les services de la Ville de Paris (Parc Montsouris) ont bien voulu nous fournir 75 souches de coli provenant du contrôle des eaux. Nous avons fait agir sur chacune de ces souches, un bactériophage faible afin de sélectionner les plus sensibles et nous avons retenu trois d'entre elles.

Sur celles-ci nous avons fait agir quelques-uns des liquides obtenus au cours des expériences 1 à 6 ci-dessus décrites. Aucun phénomène lytique ne s'est manifesté.

Ainsi donc, nous ne sommes pas parvenus à obtenir de bactériophage à partir de nos souches R.

Il est à remarquer à ce sujet que des tentatives du même ordre ont été faites par M. et M^{me} WOLLMAN (234 à 237) et par GRATIA (238 à 241), dans le but de libérer les bactériophages contenus dans des souches lysogènes de *B. Mégathérium*.

Les premiers auteurs avaient employé le lysozyme, puis la trypsine pour dissoudre les corps bactériens et le second avait utilisé le même procédé mais en complétant l'action par l'actinomycétine.

Les résultats ont été négatifs et GRATIA les a interprétés de la façon suivante : le bactériophage intracellulaire existerait sous forme inactive par suite de sa combinaison avec les antiphages microbiens spécifiques découverts par BURNET (242 et 243) et, aussi bien le lysozyme que l'actinomycétine seraient incapables de dissocier le complexe.

Cette explication donne peut-être la raison de nos échecs.

V. — Conclusion.

Les travaux publiés montrent que certains rapports existent entre la transformation S — R des bactéries et la bactériophagie.

Rappelons les points les plus importants :

1°) La possibilité de transformer une souche S en R paraît en rapport avec sa sensibilité au bactériophage.

2°) Les cultures secondaires après bactériophagie présentent certaines ressemblances avec les formes R.

3°) La bactériophagie comme la « dissociation » engendrent des formes microbiennes filtrantes.

4°) Deux expérimentateurs : HADLEY et JIMENEZ, auraient pu obtenir du bactériophage à partir d'une forme R de bacille paratyphique.

Ces faits ainsi que ceux que nous avons observés au cours des expériences décrites dans le chapitre IV — c'est-à-dire l'apparition de formes microbiennes R dans les cas où nous avons pu mettre du bactériophage en évidence à partir de nos souches de coli — nous ont amené à émettre l'hypothèse suivante :

a) Les souches S capables de se transformer en R seraient des souches porteuses de bactériophage (souches mixtes) ;

b) La transformation en R aboutirait à la formation d'un nouvel équilibre bactérie-bactériophage permettant à ce dernier de se libérer dans certaines conditions.

Nous avons entrepris à ce sujet les expériences suivantes :

1°) Partant d'une souche ultrapure, peut-on par les moyens connus, lui faire subir la dissociation et la transformer en R ?

2°) Partant d'une souche R, peut-on la transformer en S par les moyens connus pour ultrapurifier une culture mixte ?

3°) Partant d'une souche S, peut-on la transformer en R par action du bactériophage ?

4°) Est-il possible d'extraire du bactériophage des souches R ?

Les deux premières expériences (1° et 2°) nous ont donné un résultat négatif ; mais, il nous faut remarquer qu'aucune des méthodes connues actuellement ne permet « d'ultrapurifier » avec certitude une souche microbienne donnée.

La troisième expérience nous a donné un résultat positif : elle nous a permis d'observer, par action de bactériophages sur une culture de bacille coli sur gélose, la formation de formes microbiennes ayant tous les caractères R tels que nous les avons définis dans le chapitre précédent.

Mais ces formes R sont-elles bien le résultat d'une synthèse véritable ou ne proviennent-elles pas d'une sélection sous l'influence du principe lytique de germes préexistants dans la culture microbienne en cause ?

Nous croyons que cette hypothèse de sélection est à écarter et voici pourquoi :

a) Nous avons trouvé que suivant les conditions de l'expérience (incubation à 37° ou à 20°), l'action d'un bactériophage anticoli sur une même quantité de culture de bacille coli S aboutit à un nombre différent de colonies rugueuses ;

b) Un même nombre de microbes « lisses » soumis à l'action de 2 bactériophages différents, ne donne pas le même nombre de colonies rugueuses ;

c) Pour une même quantité de bactériophage le nombre des colonies rugueuses obtenues n'est pas proportionnel au nombre de microbes mis en jeu ;

d) Le nombre de colonies rugueuses obtenues à partir d'une même quantité d'un même microbe, varie avec l'activité du bactériophage mis en jeu ;

e) Enfin, le bactériophage agissant sur des cultures microbiennes âgées (qui devraient contenir davantage de formes R si celles-ci préexistaient), ne permet pas d'obtenir davantage de colonies rugueuses que lorsqu'il agit sur des cultures jeunes du même microbe contenant une quantité égale de germes vivants.

Les formes microbiennes R prennent naissance, nous venons de le dire, par action de bactériophage sur le microbe et elles ne paraissent pas dues à une sélection des germes préexistants. Avant d'interpréter ces faits en faveur de notre hypothèse, il faut voir si ces formes R ne résultent pas d'une action du bactériophage sur la cellule microbienne (par exemple action lytique sur la fraction constituant l'antigène H) ; mais cette action se produisant en dehors de toute fixation du bactériophage sur la cellule — fixation aboutissant à une souche mixte comme nous en avons émis l'hypothèse.

Nous ne croyons pas que les choses se passent ainsi car nous avons vu dans nos expériences, qu'à côté des formes R typiques que l'on peut obtenir par action du bactériophage anticoli sur le microbe sensible, on remarque des petites colonies non repiquables, ayant l'aspect R particulièrement accentué. Ces colonies sont constituées par des microbes en partie lysés ; elles sont porteuses de principe lytique, et il est permis de se demander si ce dernier, peut-être responsable du caractère R si accentué de ces colonies, ne provient pas de la rupture à son profit de l'équilibre bactérie-bactériophage dont nous cherchons à vérifier l'existence dans les souches R.

Certaines colonies muqueuses qui se forment à côté de ces petites colonies R méritent également d'attirer l'attention. Elles sont lysogènes, c'est-à-dire porteuses de bactériophage qui se libère aisément dans les cultures en bouillon, et elles ont acquis la propriété d'agglutiner fortement avec le réactif de Millon.

Dans le cas de ces colonies muqueuses et dans celui des petites colonies R, le bactériophage semble donc bien être la cause de l'acquisition de caractères R (partiel par la positivité de la réaction de Millon pour les premières et totaux pour les seconds).

Il nous restait à envisager la possibilité d'extraction de bactériophage des formes R (4^e expérience).

Nous avons répété sans succès la technique utilisée par HADLEY et JIMENEZ (*loc. cit.*). Nous n'avons pu davantage en extraire, en soumettant la culture R à des conditions dysgoniques (milieux très riches en peptone, milieux hypersalés ou alcalinisés, température d'incubation de 42°).

Pensant à une sensibilité insuffisante de notre souche détectrice, nous en avons recherché d'autres mais aucune parmi les 3 que nous avons sélectionnées sur 75 essayées — ne nous a permis de mettre du bactériophage en évidence par traitement de nos souches R.

En somme, deux faits importants semblent donner raison à notre hypothèse : 1°) la possibilité d'obtenir des formes R par action du bactériophage spécifique sur des cultures de coli sensible ; 2°) la production simultanée de colonies mixtes contenant du bactériophage, ayant acquis tout ou partie des caractères R.

Ces faits ne paraissent cependant pas suffisants pour permettre de l'accepter sans réserve et de nouvelles recherches portant spécialement sur la recherche d'un détecteur, méritent d'être entreprises.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION

Avant d'aborder l'étude de l'extraction et du titrage des bactériophages anticoli, étude constituant l'objet principal du présent travail, il était nécessaire de définir les souches microbiennes devant servir à nos expériences. Ceci nous a amené à passer en revue, dans un premier chapitre, les différentes classifications proposées pour les microbes du groupe coli et à adopter celle de MALCOLM.

Nous avons effectué les épreuves indiquées par cet auteur sur 16 souches microbiennes coliformes et nous avons retenu 15 d'entre elles pour nos essais.

Nous avons examiné ensuite dans un deuxième chapitre les sources connues de bactériophages anticoli ainsi que les techniques d'extraction ; nous avons souligné à ce sujet l'importance des phénomènes d'adsorption et appliqué une technique d'élution par des solutions phosphatées alcalines, à l'extraction des bactériophages anticoli contenus dans les déjections animales.

Poursuivant nos recherches, nous avons constaté que les boues de décantation des eaux d'égoûts contiennent des bactériophages qui peuvent aussi être facilement extraits par élution.

Une autre nouvelle et intéressante source de principes lytiques anticoli est constituée par les boues alumineuses qui proviennent de la clarification des eaux de rivières.

Des bactériophages ont été extraits de ces diverses sources ainsi que de préparations de pancréatine commerciale. L'isolement de races pures a été pratiqué et l'exaltation de l'activité effectuée par la technique des passages.

Les principes les plus actifs ont été obtenus à partir des boues de décantation des eaux d'égoûts.

Dans le troisième chapitre, nous avons étudié les méthodes (des dilutions et des plages sur gélose) qui permettent de titrer les suspensions de corpuscules lytiques anticoli.

A propos de la méthode des dilutions, nous avons précisé certaines conditions d'application qui sont les suivantes :

a) La méthode n'est applicable qu'au titrage des corpuscules virulents.

b) Il faut ensemençer les dilutions de bactériophages avec un nombre de microbes sensibles égal au maximum à 150×10^6 pour 10 c.c.³ de bouillon.

c) Laisser l'incubation se faire à 20° et lire les résultats après 24 heures.

d) Diluer la dernière dilution active dans 10 nouveaux tubes qui seront à leur tour éprouvés quant à leur teneur en principes lytiques — ceci afin d'augmenter la précision de la méthode.

e) Faire plusieurs déterminations et prendre la moyenne.

Les méthodes de numération des bactériophages par formation de plages sur gélose ont ensuite retenu notre attention. Celle de d'HÉRELLE est la plus connue et a été le plus largement appliquée. Nous avons examiné les différents facteurs qui peuvent intervenir pour son application et discuté les causes d'erreurs qu'elle comporte.

Ceci nous a conduit à adopter une technique dont le principe donné par GRATIA consiste à étaler sur gélose, non plus un très petit volume de culture microbienne et de bactériophage dilué mais un volume plus important (1 c.c.³) d'un mélange tiède de gélose à 1,25 %, de bactériophage et de culture microbienne.

Nos expériences ont porté sur cette technique que nous avons étudiée en détail et pour laquelle nous préconisons les conditions d'application suivantes :

Le mélange à étaler doit renfermer un nombre de microbes vivants compris entre $0,7 \times 10^8$ et $1,4 \times 10^9$ par c.c.³.

La présence de microbes morts, faussant les résultats, il est nécessaire d'utiliser des cultures microbiennes jeunes.

Le bactériophage doit être dilué de telle sorte qu'il y ait un maximum de 600 plages sur une boîte de Pétri de 100 mm. de diamètre.

La méthode ne convient qu'au titrage des bactériophages virulents.

Nous avons aussi établi que les chiffres trouvés varient, dans une assez large mesure, suivant la souche microbienne sensible employée. On doit donc définir le titre d'une suspension de bactériophages, non en valeur absolue mais relativement à une souche microbienne donnée.

La comparaison des résultats donnés par les trois méthodes

de titrage, (dilution, d'Hérelle, Gratia), en utilisant la même souche microbienne, montrent que les chiffres trouvés sont les plus forts avec la troisième technique ; la seconde donnant elle-même des chiffres plus élevés que la première. La méthode de GRATIA nous paraît donc plus précise que les deux autres.

Ayant extrait des bactériophages des milieux naturels et ayant déterminé la méthode de titrage nous paraissant la meilleure, nous nous sommes proposé (chapitre IV) de vérifier ou d'étendre aux bacilles du groupe coli, les diverses techniques préconisées par certains auteurs pour l'extraction de bactériophages à partir des souches microbiennes elles-mêmes.

Nous avons donc répété la plupart de ces expériences sur quelques-unes de nos souches, mais nous n'avons pu obtenir des principes lytiques que dans trois cas : culture en présence de chlorure de calcium, en milieu alcalinisé et vieillissement en bouillon — et ce résultat n'a été obtenu que de façon irrégulière. Il ne semble donc pas, dans le cas du bacille coli, que l'on puisse considérer les souches microbiennes elles-mêmes comme source pratique pour l'extraction des bactériophages correspondants.

Ces expériences nous ont cependant permis de constater un fait intéressant : dans les trois cas où des bactériophages ont pu être mis en liberté à partir des souches microbiennes, nous avons observé parallèlement l'apparition de colonies microbiennes « R » (suivant ARKWRIGHT).

Ce fait nous a amené à l'étude de la variation S—R des bactéries ; études que nous avons entreprise dans la première partie du chapitre V. Après avoir défini les caractères des formes rugueuses, nous avons fait subir la transformation S—R à quelques-unes de nos souches et nous avons pu constater au cours de ces essais que toutes les souches de *B. coli* ne sont pas également aptes à subir la variation : certaines la subissent facilement, d'autres partiellement, certaines autres, pas du tout.

Nous avons ensuite envisagé les rapports entre la bactériophagie et la transformation S—R. Après avoir rassemblé les faits connus sur ce sujet, nous avons émis une hypothèse d'après laquelle les formes S capables de subir la dissociation seraient porteuses d'un bactériophage inapparent ; la transformation S—R aboutissant à un nouvel équilibre bactérie-bactériophage à la faveur duquel ce dernier pourrait manifester son action.

Dans le but de vérifier l'exactitude de cette façon de voir, nous avons entrepris plusieurs expériences dont nous ne retiendrons dans cette conclusion que le résultat suivant : Par action de bactériophage sur des cultures de bacilles coli S, il est possi-

ble, dans certaines conditions, d'observer sur gélose, la formation de colonies R typiques de ce microbe.

On peut interpréter ce résultat, d'après notre hypothèse, comme la réalisation d'une union bactérie + bactériophage, mais on peut aussi envisager les explications suivantes :

a) Les formes R observées préexistaient dans la culture ; elles n'ont été mises en évidence que grâce à une sélection réalisée par le bactériophage et éliminant seulement les formes S ;

b) Elles peuvent aussi résulter d'une transformation des formes S par l'action du bactériophage mais ceci en dehors de toute association bactérie-bactériophage.

Les expériences que nous avons faites à ce sujet ne paraissent pas en accord avec les deux explications ci-dessus qui, à notre avis, ne peuvent être retenues.

Il reste donc l'hypothèse que nous avons émise sur la nature des formes R. Nous pensons que si les faits que nous avons observés ne permettent pas de l'établir de façon certaine, ils apportent du moins quelques éléments en sa faveur.

*Vu : Le Doyen de la Faculté
de Pharmacie,*

O. DAMIENS.

*Vu :
Le Président de la Thèse,*

J. REGNIER.

*Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
Gilbert GIDEL.*

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ

LE MODE D'ACTION DES SULFAMIDES

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	11
INTRODUCTION	15

CHAPITRE I

CLASSIFICATION DES MICROBES DU GROUPE COLI

A. — Exposé et discussion des classifications connues :	
I. — Caractères généraux des microbes du groupe coli...	37
II. — Classification dans le groupe coli.....	39
III. — Conclusion	47
B. — Caractères et classification de nos souches.....	47
C. — Conclusion	53

CHAPITRE II

EXTRACTION DES BACTERIOPHAGES ANTI-COLI DES MILIEUX NATURELS

A. — Sources connues de bactériophages anti-coli :	
I. — Déjections	55
II. — Eaux de rivières	56
III. — Eaux d'égouts	57
IV. — Sources diverses	57
B. — Techniques connues d'extraction des bactériophages des milieux naturels	58
C. — Travaux personnels :	
I. — Extraction de nos bactériophages.....	61
a) des déjections	62
b) des boues de décantation d'eaux d'égouts.....	65
c) des boues d'alumine provenant de la classification des eaux de rivière.....	65
d) des pancréatines commerciales.....	67
II. — Conclusion.....	70

CHAPITRE III

TITRAGE DES BACTERIOPHAGES ANTI-COLI

PREMIÈRE PARTIE

MÉTHODE DES DILUTIONS

Principe	73
A. — Travaux antérieurs :	
I. — Exposé de ces travaux.....	73
II. — Précision de la méthode.....	74
B. — Travaux personnels :	
I. — Influence du milieu de culture.....	75
II. — Influence de la quantité de microbes.....	75
III. — Influence de la température d'incubation.....	76
IV. — Influence de la durée d'incubation.....	77
V. — Influence de la virulence du bactériophage.....	77
VI. — Titrage de nos bactériophages.....	80
Technique employée	80
Résultats	81
VII. — Conclusion	81

MÉTHODE DE KRUEGER

DEUXIÈME PARTIE

MÉTHODE DES PLAGES SUR GÉLOSE

A. — Exposé et discussion des travaux antérieurs :	
I. — Méthode de d'Hérelle.....	84
a) Technique	84
b) Influence de la teneur en gélose du milieu.....	86
c) Influence de la quantité de microbes.....	86
d) Influence des microbes morts.....	87
e) Influence de la sensibilité du microbe.....	88
f) Proportionnalité entre le nombre des plages et le nombre des corpuscules.....	89
g) Influence de la qualité du bactériophage...	90
h) Influence de l'étalement.....	91
i) Autres facteurs	92
j) Conclusion	93
II. — Méthode de Dreyers et Campbell-Renton.....	94
III. — Méthode de Yen.....	95
IV. — Méthode de Gratia.....	96
B. — Travaux personnels :	
I. — Technique utilisée	97
II. — Influence du nombre de microbes.....	98
III. — Influence des microbes morts.....	99
IV. — Proportionnalité entre le nombre de plages et le nombre de corpuscules	101
V. — Influence de la souche microbienne.....	102
VI. — Précision de la méthode.....	104
VII. — Conclusion	105

CHAPITRE IV

PRODUCTION DE BACTERIOPHAGE ANTI-COLI A PARTIR DES SOUCHES MICROBIENNES ELLES-MEMES

A. — Travaux antérieurs :	
a) Souches lysogènes	109
b) Souches apparemment non lysogènes :	
I. — Production de bactériophages par action des leucocytes sur les microbes.....	113
II. — Antagonisme microbien.....	114
III. — Bactériophagie déclanchée par un « activateur »	115
IV. — Production de bactériophage par culture de microbes en milieu alcalinisé.....	117
V. — Production de bactériophage par culture de microbes en milieu additionné de chlorure de calcium	117
VI. — Obtention de bactériophage par traitement des cultures avec du gel d'alumine.....	118
VII. — Bactériophage à partir des vieilles cultures microbiennes	119
VIII. — Expérience de Rosenthal.....	121
B. — Essais de vérification ou d'extension de ces travaux aux bacilles coli. — Discussion :	
I. — Recherche du caractère lysogène de nos souches	122
II. — Essais de production de bactériophage par action des leucocytes sur le bacille coli <i>in vitro</i>	123
III. — Essais de production de bactériophage anti-coli par antagonisme microbien.....	125
IV. — Essais de production de bactériophage par action d'un « activateur » sur le bacille coli..	126
V. — Essais de production de bactériophage par culture de bacille coli en milieu alcalinisé....	130
VI. — Essais de production de bactériophage par culture de bacille coli en milieu additionné de chlorure de calcium	131
VII. — Essais d'obtention de bactériophage par traitement de cultures de bacille coli avec du gel d'alumine	133
VIII. — Essais d'obtention de bactériophage à partir de vieilles cultures de coli.....	134
IX. — Expériences de Rosenthal.....	137
X. — Conclusion	138

CHAPITRE V

PREMIÈRE PARTIE

LA TRANSFORMATION S — R

A. — Faits essentiels connus :	
I. — Caractères des formes R	141
II. — Formes intermédiaires	143
III. — Conditions de la transformation.....	144
IV. — Transformation S — R	147
V. — Signification de la transformation S — R	148

B. — Travaux personnels :

I. — Caractères R ou S de nos souches.....	149
II. — Préparation de quelques souches R :	
a) Vieillissement des cultures en bouillon à la caséine.....	151
b) Culture sur milieu additionné de chlorure de calcium	153
c) Conclusion	154

DEUXIÈME PARTIE

LE BACTERIOPHAGE DANS SES RAPPORTS
AVEC LA TRANSFORMATION S — R

A. — Travaux antérieurs.....	156
B. — Travaux personnels :	
a) Hypothèse émise	157
b) Essais de vérification de cette hypothèse :	
I. — Essais de « dissociation » d'une culture ultra-pure	158
II. — Essais de transformation d'une souche R en S par les moyens connus pour ultrapurifier une souche mixte	161
III. — Transformation S — R par le bactériophage..	161
IV. — Essais d'obtention de bactériophage à partir d'une souche R	174
V. — Conclusions	178
Conclusions générales.....	183

BIBLIOGRAPHIE

1. D'HERELLE. — Ann. Inst. Past. (1914), 285.
2. BECHOLD et VILLA. — Z. Hyg. Infekt. (1925), **105**, 601.
3. BORREL. — C. R. Soc. Biol. (1928), **98**, 947.
4. BURNET. — J. of Path. and Bact.^o (1932), **35**, 851.
5. SCHLESINGER. — Z. Hyg. Infekt. (1933), **115**, 774.
6. NORTHROP. — Science (1936), **84**, 90.
7. FLEMMING. — Proc. Roy. Soc. London (1922), série B, **93**, 306.
8. BORDET. — Ann. Inst. Past (1925), 723.
9. TOYODA. — Centralbl. f. Bakt. (1931), **123**, 60.
10. BRILL. — Bull. Inst. Past. (1934), 1068.
11. SONNENSCHN. — C. R. Soc. Biol. (1935), **119**, 1024.
12. HODER. — Zeitschr. f. Imm. (1934), **34**, 46.
13. MAC NEAL. — J. Inf. Dis. (1938), **63**, 25.
14. ARLOING, JOSURAND et NAHRUM. — C. R. Soc. Biol. (1930), **104**, 1246.
15. KENDRICK. — Am. Journ. Hyg. (1933), **18**, 442.
16. DEMOLON et DUNEZ. — Ann. Agronom. (1935), **111** p. 89.
17. ESCHERICH. — Fortschr. Med. (1885), **3**, 515, 547.
18. THEOBALD SMITH. — Am. J. Med. Sci. (1895), **110**, 283.
19. VOGES et PROSKAUER. — Z. Hyg. (1898), **28**, 20.
20. DURHAM. — J. Exp. Med. (1901), **5**, 353.
21. MAC CONKEY. — J. Hyg. (1905), **5**, 333.
22. MAC CONKEY. — J. Hyg. (1909), **9**, 86.
23. BERGEY et DUHAN. — J. Med. Res. (1908), **19**, 175.
24. JACKSON. — Am. J. Publ. Health. (1911), **1**, 930.
25. HOWE. — Science (1912), **35**, 225.
26. KLIGER. — J. Bact. (1918), **3**, 313.
27. ROGER et COLES. — J. Inf. Dis. (1914), **14**, 411.
28. CLARK et LUBS. — J. Inf. Dis. (1915), **17**, 160.
29. LEVINÉ. — J. Bact. (1916), **1**, 87.
30. LEVINE. — J. Bact. (1916), **1**, 153.
31. LEVINE. — J. Inf. Dis. (1916), **18**, 358.
32. JOHNSON. — J. Bact. (1916), **1**, 96.
33. HULTON. — J. Inf. Dis. (1916), **19**, 606.
34. JOHNSON et COLLIS. — J. Bact. (1917), **2**, 379.
35. LEVINE. — J. Bact. (1918), **3**, 253.
36. MACKIE. — Trans. Roy. Soc. (1921), **9**, 315.
37. KOSER. — J. Bact. (1924), **9**, 59.
38. BERGEY. — Manual of Determinative Bacteriology, London (1924).
39. BERGEY. — Manual of Determinative Bacteriology (1934).
40. MALCOLM. — J. of Hyg. (1938), **38**, 395.
41. MACKIE. — Trans. Roy. Soc. (1921), **9**, 315.
42. MALCOLM. — J. Dairy. Res. (1933), **5**, 15 et (1935), **6**, 383.
43. HAY. — J. of Hyg. (1932), **32**, 240.
44. RUCHHOFT. — J. Bact. (1931), **21**, 407 et **22**, 125.

45. HARDEN et NORRIS. — J. Physiol. (1911), **42**, 332.
46. DUJARRIC DE LA RIVIERE et CHU. — Rev. d'Hyg. et de Méd. Prév. (1931), **53**, N° 4.
47. O'MEARA. — J. Path. (1931), **34**, 401.
48. D'HERELLE. — C. R. Ac. Sc. (1918), **167**, 970.
49. D'HERELLE. — C. R. Ac. Sc. (1920), **170**, 72.
50. HAUDUROY. — C. R. Soc. Biol. (1923), **89**, 875.
51. I. LIPSKA. — C. R. Soc. Biol. (1933), **112**, 1463.
52. DEBRE et HAGENAU. — C. R. Soc. Biol. (1920), **83**, 1348.
53. DUMAS. — C. R. Soc. Biol. (1920), **83**, 1314.
54. DA COSTA CRUZ. — Mem. Inst. Oswaldo Cruz, (1922), **14**, 81.
55. WAGEMANS. — Travaux du Laborat. de l'Université de Louvain.
56. MAKASHISHI. — C. R. Soc. Biol. (1936), **122**, 38.
57. MARCUSE. — Centralbl. f. Bakt. I. (1931), **120**, 66.
58. RAKNOWITZ. — Klin. Woch. (1932), N° 19, p. 807.
59. LEINOS MONTEIRO. — Rev. Soc. Paulista, Med. Veter. (Sao Paulo) (1933), **1**, 55.
60. LIPSKA. — Bull. Institut. Océanogr. (Monaco) (1935), **675**, 1-8.
61. D'HERELLE. — Le Bactériophage et son comportement, (Masson) 1925.
62. CALDWELL. — J. Inf. Dis. (1927), **40**, 575.
63. LARKUM. — J. of Bact. (1926), **XII**, 203.
64. HAUDUROY. — Le Bactériophage de d'Hérelle, (Le François) 1925.
65. FEJGIN. — C. R. Soc. Biol. (1926), **95**, 659.
66. BERGONZINI et LI-YEN-YOUNG. — Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. (1934), N° 4, page 289.
67. FRANCO. — Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. (1928), **3**, 1332.
68. ARLOING. — C. R. Soc. Biol., (1926), **94**, 191.
69. ARLOING. — C. R. Soc. Biol. (1926), **94**, 428.
70. ARLOING. — C. R. Soc. Biol. (1926), **94**, 708.
71. MONTEIRO. — C. R. Soc. Biol. (1927), **95**, 994.
72. MANOLIN et COSTIN. — C. R. Soc. Biol. (1920), **93**, 384.
73. BUJANOWSKI. — Centralbl. f. Bakt. (1928), **58**.
74. ELDER et TAUNER. — J. Inf. Dis. (1930), 43.
75. MAZETTI. — Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. (1930), **5**, 605.
76. STEWART et GLOSAL. — Ind. J. Med. Res. (1931), **19**, 137.
77. NYBERG. — Centralbl. f. Bakt. (1931), **122**.
78. GILDEMEISTER et WATANABE. — Centralbl. f. Bakt. (1931), **122**.
79. VON VAGEDES. — Centralbl. f. Bakt. (1932), **126**, 287.
80. SCHLOSSMANN. — Zeitschr. Hyg. u. Infektions Kr. (1932), **114**, 65.
81. VON VAGEDES et GILDEMEISTER. — Centralbl. f. Bakt. (1934), **131**, 414.
82. DIENERT, ETRILLART et Mme LAMBERT. — C. R. Soc. Biol. (1934), **199**, 102.
83. SHURMANN. — Centralbl. f. Bakt. I. (1934), **132**, 321.
84. SHURMANN. — Centralbl. f. Bakt. I. (1936), **136**, 129.
85. SHURMANN. — Geneesk. Tijdschr. Ned. Indic. (1935), **75**, 1540.
86. DE ASSUMPCAO et RODOVALLO. — Boll. Inst. Hyg. Sao Paulo, (1934), **53**, 1.
87. NICK. — Centralbl. f. Bakt. (1936), **136**, 397.
88. BRUSCO. — Rev. Sud. Americ. Endocrin., Immun. y. Quimister. (1935), **18**, 14.
89. Mme PANAYOTATOU. — Acad. Méd., 26 Nov. 1935.
90. D'HERELLE. — Le phénomène de la guérison dans les maladies infectieuses (Masson) 1938.
91. NAKASHIMA. — Centralbl. f. Bakt. (1925), **94**, 303.
92. COSTA. — Bol. Assoc. Med. Puerto-Rico (1928), **21**, 13.
93. BUJANOWSKI. — Arch. Hyg. u. Bakt. (1929), **101**, 318.
94. TOUGH. — C. R. Soc. Biol. (1930), **105**, 198.

95. BULGAKOV et SERTIC. — C. R. Soc. Biol. (1930), **104**, 1258.
96. BECKWITH et ROSE. — J. Bact. (1930), **20**, 151.
97. NYBERG. — Acta Path. et Microbiol. Scand. (1933), **16**, 269.
98. D'HERELLE. — C. R. Ac. Sc. (1919), **168**, 631.
99. HAUDUROY. — C. R. Soc. Biol. (1923), **89**, 875.
100. D'HERELLE. — Le Bactériophage, son rôle dans l'immunité, (Masson) 1921.
101. LIPSKA. — Le lait, (1932), **12**, 88.
102. HODER et SUZUKI. — Centralbl. f. Bakt. I. (1926), **98**, 433.
103. THOMAS. — Ztschr. Immunit. forsch. (1929), **63**, 521.
104. KLIENEBERGER. — Ztschr. Immun. u. Exp. Ther. (1928), **56**, 32.
105. COMBIESCO. — C. R. Soc. Biol. (1922), **87**, 17.
106. FLU. — C. R. Soc. Biol. (1923), **89**, 970.
107. SHOPE. — J. Exp. Med. (1927), **45**, 1037.
108. PICO. — C. R. Soc. Biol. (1922), **86**, 1106.
109. KUTTNER. — Proc. Soc. exp. Biol. and Med. (1921), **18**, 222.
110. GJORUP. — Acta. Med. Scandin. (1924), suppl. **7**, 365.
111. BORCHARDT. — Zeitschr. f. Immun. (1923), **37**, 1.
112. MICHIO KASANARA. — Centralbl. f. Bakt. I. (1936), **136**, 143.
113. FORTUNATO. — Annali d'Igiene (1928), **38**.
114. FEJGIN. — C. R. Soc. Biol. (1926), **95**, 659.
115. RHODES et LUDLAM. — J. Hyg. (1939), **39**, 658.
116. CALDWELL. — J. Inf. Dis. (1927), **40**, 575.
117. NICK. — Centralbl. f. Bakt. I. (1936), **186**, 397.
118. ASHESHOW. — C. R. Soc. Biol. (1925), **92**, 362.
119. BORDET et CIUCA. — C. R. Soc. Biol. (1920), **83**, 1296.
120. TOMASELLI. — Monographie, Milan 1923 (A. Cordiani).
121. HAUDUROY. — C. S. Soc. Biol. (1922), **87**.
122. WEINBERG et AZNAC. — C. R. Soc. Biol. (1922), **87**, 136.
123. SERTIC et BULGAKOV. — C. R. Soc. Biol. (1935), **119**, 492.
124. D'HERELLE. — C. R. Ac. Sc. (1919), **168**, 631.
125. D'HERELLE. — C. R. Ac. Sc. (1920), **170**, 72.
126. GILDEMEISTER et HERZBERG. — Klin. woch. (1924), **3**, 186.
127. SEIFFERT. — Klin. woch. (1923), **2**, 1479.
128. MURAINATURA. — Japan Journ. Exp. Med. (1932), **10**, 257.
129. DE POORTER et MAISIN. — Arch. Intern. Pharmacod. (1921), **25**, 473.
130. DE NECKER. — C. R. Soc. Biol. (1922), **87**, 127.
131. MAC KINLEY et DOUGLAS. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1930), **27**, 844.
132. JAUMAIN et Mlle MEULEMANS. — C. R. Soc. Biol. (1922), **87**, 362.
133. DA COSTA CRUZ. — Institut oswaldo Cruz (1922).
134. APPELMANS. — C. R. Soc. Biol. (1921), **85**, 1098.
136. WERTHEMANN. — Arch. f. Hyg. (1922), **91**, 255.
137. BRONFENBRENNER et KORB. — J. Exp. Med. (1926), **42**, 483.
138. CLARK. — J. Gen. Physiol. (1927-1928), **11**, 71.
139. BERGSTRAND. — Centralbl. f. Bakt. (1930), **116**, Abt. I, 481.
140. KRUEGER. — Science (1932), **75**, 494.
141. D'HERELLE. — C. R. Ac. Sci. (1917), **2**, **165**, 373.
142. BAIL. — Wiener Med. Woch. (1921), 555.
143. GRATIA. — J. Exp. Med. (1921), **34**, 115.
144. GJORUP. — [Investigations into d'Herelle's phenomenon (Copenhagen 1925)].
145. ELIAYA et POZERSKI. — C. R. Soc. Biol. (1921), **84**, p. 708.
146. GILDEMEISTER et HERZBERG. — Centralbl. f. Bakt. (1924), **91**, 228.
147. ELLIS. — J. Gen. physiol. (1938), **22**, 383.
148. NAKAMURA. — Arch. f. Hyg. (1923), **92**, 61.

149. YEN. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1936), **32**, 1006.
150. BURNET. — *J. of Path. and Bact.* (1925), **28**, 483.
151. ASHESHOV. — *C. R. Soc. Biol.* (1923), **89**, 120.
152. D'HERELLE. — [The bacteriophage and its behaviour (Baltimore 1926)].
153. MARSHALL. — *J. Inf. Dis.* **87**, 126.
154. DREYER et CAMPBELL RENTON. — *J. of Path. and Bact* (1933), **36**, 399.
155. MEISSNER. — *Zentralbl. f. Bakt. I. Orig.* (1924), **93**, 489.
156. GOHS et JACOBSON. — *Zeitschr. f. Imm.* (1927), **49**, 412.
157. WOLLMANN. — *C. R. Soc. Biol.* (1940), **133**, 256.
158. GRATIA. — *C. R. Soc. Biol.* (1921), **84**, 750.
159. BORDET. — *Ann. Inst. Past.* (1925), **39**, 740.
160. KLIGER et OLITZKI. — *Brit. J. Exp. Path.* (1932), **13**, 237.
161. NICOLLE. — *C. R. Soc. Biol.* (1941), **135**, 548 et 709.
162. KNORR et RUFF. — *Centralbl. f. Bakt.* (1934), **133**, 289.
163. MOLINA. — *Centralbl. f. Bakt. I.* (1936), **135**, 452.
164. GRATIA. — *C. R. Soc. Biol.* (1936), N° 27, 323.
165. A. KAPLAN. — Thèse Pharmacie, Paris 1931.
166. BORDET ET CIUCA. — *C. R. Soc. Biol.* (1920), p. 1296.
167. GILDEMEISTER et HERZBERG. — *Zentralbl. f. Bakt. I. Orig.* (1924), **93**, 402.
168. PROCA. — *C. R. Soc. Biol.* (1938), **129**, 331.
169. KLINE. — *Am. J. of Path.* (1927), **3**, 561.
170. BURNET. — *J. Path. and Bact.* (1932), **35**, 85.
171. SMITH et JORDAN. — *Journ. immun.* (1928), **15**, 125.
172. LOMINSKI. — *C. R. Soc. Biol.* (1938), **129**, 151.
173. BORDET et CIUCA. — *C. R. Soc. Biol.* (1920), **83**, 1293.
174. BAIL. — *Wiener Klin. Wochr.* (1931), p. 447.
175. BLAIR. — *J. Inf. Dis.* (1924), **35**, 401.
176. LISBONNE et CARRERE. — *C. R. Soc. Biol.* (1922), **86**, 340.
177. JERMOLJUVA, BUJANOWSKAJA et SEVERIN. — *Zeit. f. Immunit.* (1931), **73**, 350.
178. LE MAR et MYERS. — *J. Inf. Dis.* (1935), **57**, 6.
179. BRONFENBRENNER. — *J. Exp. Med.* (1927), **45**, 873.
180. EATON. — *J. Bact.* (1931), **21**, 143.
181. GOLDI. — *Zeitschr. f. exp. Med.* (1930), **72**, 598.
182. PLANTUREUX. — *C. R. Ac. Sci.* (1930), **190**, 224.
183. PLANTUREUX. — *C. R. Sci.* (1930), **190**, 387.
184. STEFANO et BEAUFORT. — *C. R. Soc. Biol.* (1925), **93**, 1380.
185. BEGUET. — *Ann. Inst. Past. Alg.* (1927), **5**, 1925.
186. BERNARD et GUILLERM. — *C. R. Ac. Sci.* (1933), **196**, 1339.
187. NORTHROP. — *Physiol. Review* (1937), **17**, 144.
188. BERNARD et GUILLERM. — *C. R. Ac. Sci.* (1933), **197**, 201.
189. OTTO, MUNTER et WINCKLER. — *Zeitschr. f. Hyg.* (1922), **118**.
190. BAIL. — *Klin. woch.* (1921), **20**, 37.
191. FUKUDA. — *Zeitschr. f. Immunit.* (1927-1928), **54**, 369.
192. ROSENTHAL. — *C. R. Soc. Biol.* (1930), **30**, 351.
193. Mlle LE SOUDIER et J. VERGE. — *C. R. Soc. Biol.* (1931), **106**, 783.
194. DE POORTER et MAISIN. — *Arch. Int. Pharm. et Thér.* (1921), **25**, 473.
195. KABESHIMA. — *C. R. Soc. Biol.* (1920), **83**, 219.
196. VOET. — *C. R. Soc. Biol.* (1936), 1248.
197. LOMINSKI. — *C. R. Soc. Biol.* (1935), 1090.
198. ARKWRIGHT. — *J. Path. et Bact.* (1919-1920), **23**, 358.
199. ALESSANDRINI et SABATUCCI. — *Ann. d'Ig.* (1931), **41**, 39.
200. ARKWRIGHT. — *J. Path. et Bact.* (1921), **24**, 36.

201. KOSER et STYRON. — J. Inf. Dis. (1930), **47**, 453.
202. DIENST. — J. of. Bacteriol. (1933), **26**, 489.
203. KULP et RETTGER. — J. of. Bact. (1924), **9**, p. 357.
204. REIMANN. — J. Exp. Med. (1925), **41**, 587.
205. DULANEY. — J. Inf. Dis. (1928), **42**, 575.
206. HADLEY. — J. Inf. Dis. (1927), **41**, 209.
207. O'NEAL. — J. of. Bact. (1923), **26**, 521.
208. HADLEY. — J. Inf. Dis. (1931), **48**, 1.
209. BRAUN et SCHAEFFER. — Zischr. f. Hyg. (1919), **89**, 339.
210. FEILER. — Ztschr. f. Immun. (1920), **29**, 303.
211. WEBSTER. — J. Exp. Med. (1925), **41**, 571.
212. DE KRUIF. — J. Exp. Med. (1921), **33**, 773.
213. SAVAGE et WHITE. — Special Report 91. Med. Res. Council 1925.
214. SCHULTZE. — J. Hyg. (1921), **20**, 330.
215. GRIFFITH. — Report 18 on Publ. Health. Ministr. of Health (1923).
216. JORDAN. — J. Am. Med. Ass. (1926), **86**, 177.
217. LARKUM. — Am. J. Publ. Health. (1928), **18**, 647.
218. BURNET. — J. Path. and Bact. (1929), **22**, 15.
219. BORDET et RENAUX. — Ann. Inst. Past. (1932), 535.
220. COWLEY. — J. Inf. Dis. (1932), **50**, 358.
221. KULP et RETTGER. — J. of. Bact. (1924), **29**, 375.
222. EASTWOOD. — Report 18 or Publ. Health. and Med. Subjects. — Ministry of Health (1923).
223. HODER. — Ztschr. f. Imm. (1925), **42**, 197.
224. HADLEY. — J. Inf. Dis. (1927), **40**, 1.
225. GRIFFITH. — Report 18 or Publ. Health and Med. Subjects. — Ministry of Health (1923).
226. BORDET. — Ann. Inst. Past. **24**, 476.
227. DE KRUIF. — J. Exp. Med. (1921), **33**, 621.
228. AMOSS. — J. Exp. Med. (1925), **40**, 649.
229. HADLEY et JIMENEZ. — J. Inf. Dis. (1931), **48**, 178.
230. BRUYNOGHE. — C. R. Soc. Biol. (1921), **85**, 20.
231. PLANTUREUX. — C. R. Soc. Biol. (1930), **104**, 956.
232. FLU. — Centralbl. f. Bakt. I. O. (1923), **90**, 374.
233. LOMINSKI. — C. R. Soc. Biol. (1938), **129**, 264.
234. M. et Mme WOLLMAN. — C. R. Soc. Biol. (1935), **119**, 47.
235. — — — Ann. I. P. (1936), **56**, 316.
236. — — — C. R. Soc. Biol. (1936), **122**, 190.
237. — — — C. R. Soc. Biol. (1939), **131**, 442 et 614.
238. GRATIA. — C. R. Soc. Biol. (1936), **122**, 812.
239. GRATIA. — C. R. Soc. Biol. (1936), **123**, 322.
240. GRATIA. — Ann. I. P. (1936), **57**, 652.
241. GRATIA. — C. R. Soc. Biol. (1939), **132**, 330.
242. BURNET. — J. of Path. and Bact. (1933), **37**, 179.
243. BURNET. — Brit. J. Exp. Path. (1933), **14**, 302.
244. KRUEGER. — J. Gén. Physiol. (1929-1930), **13**, 557.
245. MALCOLM. — J. Dairy. Res. (1933), **5**, 15 et (1935), **6**, 383.
246. HAY. — J. Hyg. (1932), **32**, 240.
247. BORDET et RENAUX. — Ann. Inst. Past. (1928), **42**, 1284 et 1335.
248. CLIFTON. — J. of Bact. (1936), **31**, 54.
249. DEMIKHOVSKY. — Microbiologie (U.R.S.S.), (1936), **5**, 730.
250. BURNET. — J. Path. et Bact. (1929), **32**, p. 15-42.
251. ARKURIGHT. — Brit. J. Exp. Path (1924), **23**.

